

***EXISTE ALGUMA RELAÇÃO ENTRE
VARIANTES DE GENES DE APOPTOSE E
PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO?***

KAREN FRANCINE KÖHLER

Dissertação de Mestrado

**CURITIBA
2005**

KAREN FRANCINE KÖHLER

***EXISTE ALGUMA RELAÇÃO ENTRE VARIANTES
DE GENES DE APOPTOSE E PÊNFIGO
FOLIÁCEO ENDÊMICO?***

**Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Genética, curso
de Pós-Graduação em Genética,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria
Luiza Petzl-Erler**

**CURITIBA
2005**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Kohler Karen Francine

Existe alguma relação entre variantes de genes de apoptose
e pênfigo foliáceo endêmico?/ Karen Francine Kohler –
Curitiba 2005

xi 87f il 30cm

Orientadora Maria Luiza Petzl-Erler

Dissertação (Mestrado, - Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em
Genética

1. Pênfigo 2. Auto-imunidade 3. Genes de apoptose I. Título
II. Petzl-Erler Maria Luiza III. Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas

DDC 616.575



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

P A R E C E R

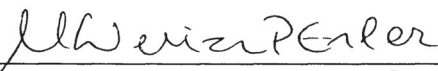
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **KAREN FRANCINE KOHLER**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito **"A"**.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

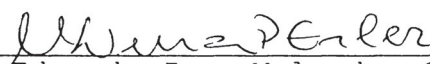
Curitiba, 22 de fevereiro de 2005.

Banca Examinadora

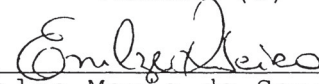




Profa Dra Maria Luiza Petzl-Erler
Orientadora e Presidente

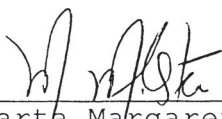


Prof Dr Eduardo Jose Melo dos Santos
Membro (1)



Profa Dra Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Membro

Visto:



Profa Dra Marta Margarete Cestari
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

(1) Membro "ad hoc"



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética



FORMULÁRIO DE JULGAMENTO DE DISSERTAÇÃO – MESTRADO

Título da dissertação:

“Existe alguma relação entre variantes de genes de apoptose e pênfigo foliáceo endêmico?”.

Autor (a): Karen Francine Kohler

Orientador (a): Maria Luiza Petzl-Erler

Análise de Dissertação outorgar os conceitos parciais e o global segundo a seguinte escala

A (Excelente = 9,0 a 10,0),

B (Bom = 8,0 a 8,9),

C (Regular = 7,0 a 7,9) e

D (Insuficiente = 0,0 a 6,9)

Somente será aprovada a dissertação que atingir conceito global C ou superior

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1 Relevância do Tema | A |
| 2 Revisão da bibliografia especializada | A |
| 3 Adequação da Metodologia | A |
| 4 Qualidade dos Dados | A |
| 5 Análise e Interpretação dos Resultados | A |
| 6 Discussão | A |
| 7 Conclusões | A |
| 8 Apresentação geral, consistência e adequação da linguagem, uso de Figuras, tabelas e gráficos | A |
| APRECIÇÃO FINAL GLOBAL | A |

Conceitos

Assinatura

Eduardo Santos

Examinador Dr Eduardo Santos

Instituição

Data do envio do julgamento 03 / 02 / 2005 Obs Data da defesa 22 / 02 / 2005

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Petzl-Erler, pela orientação criteriosa durante o mestrado, por todo o conhecimento a mim transmitido durante esses 6 anos de trabalho no Laboratório de Genética Molecular Humana, pela amizade; a minha admiração.

Aos professores do Departamento de Genética, pelos ensinamentos transmitidos ao longo desses anos, pela amizade e incentivo e pelos bons momentos compartilhados. Em especial agradeço à professora Valéria Roxo e aos professores Juarez Gabardo e Elias Karam Júnior.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Genética Molecular Humana, pelos ótimos momentos compartilhados, pelo apoio nas horas difíceis, pela ajuda no trabalho prático. Agradeço em especial às colegas Danielle, Márcia, Liana e Karin, pela amizade, pelas palavras amigas e por todos momentos harmoniosos e descontraídos proporcionados nos últimos anos.

A todos do Departamento de Genética: colegas de pós-graduação, funcionários e amigos, pela amizade e incentivo. Em especial às amigas Anilda e Valéria Romeiro.

Aos meus pais, cujo apoio foi indispensável em todos os momentos. Pelo carinho, amor, palavras de incentivo, dedicação e até mesmo certos sacrifícios que contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais esta etapa. Ao meu irmão Cristiano, pela imensa ajuda nos momentos finais do mestrado.

A todos pacientes e familiares, e demais colaboradores, que participaram deste estudo de forma desinteressada e solidária, através da doação das amostras de sangue, o meu respeito e agradecimento.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética e à sua coordenação, que possibilitaram a realização deste trabalho de dissertação.

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

*"Sua tarefa é descobrir o seu
trabalho e, então, com todo o
coração, dedicar-se a ele"
(autor desconhecido)*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 DOENÇAS DE ETIOLOGIA COMPLEXA	3
2.2 AUTOIMUNIDADE E DOENÇAS AUTOIMUNES	5
2.3 MECANISMOS DE AUTOIMUNIDADE	7
2.4 PÊNFIGO FOLIÁCEO	8
2.4.1 Histórico e Aspectos Epidemiológicos.....	8
2.4.2 Etiologia	10
2.4.3 Quadro Clínico e Classificação	13
2.4.4 Diagnóstico e Tratamento.....	15
2.4.5 Aspectos Genéticos	16
2.5 APOPTOSE.....	19
2.5.1 Aspectos Gerais	19
2.5.2 Papel da Apoptose no Desenvolvimento e na Defesa Contra Patógenos.....	20
2.5.3 A Participação de Genes de Apoptose na Autoimunidade.....	21
2.5.4 Mecanismos de Apoptose.....	23
2.6 O RECEPTOR APOPTÓTICO FAS E SEU LIGANTE (FasL).....	25
2.6.1 Histórico e Caracterização dos Genes <i>FAS</i> e <i>FASL</i>	25
2.6.2 O Receptor Fas	26
2.6.3 O Ligante de Fas (FasL)	27
2.6.4 Funções do Sistema Fas/FasL	28
2.6.5 Variabilidade Genética de <i>FAS</i>	31
2.7 O GENE SUPRESSOR TUMORAL <i>TP53</i>	34
2.7.1 Histórico e Caracterização do Gene <i>TP53</i>	34
2.7.2 O Produto Gênico p53 e suas Funções	35
2.7.3 Variabilidade Genética de <i>TP53</i>	37
2.8 A PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA <i>BAX</i>	40
2.8.1 Histórico e Caracterização do Gene <i>BAX</i>	40
2.8.2 O Produto Gênico Bax e suas Funções.....	41
2.8.3 Variabilidade Genética de <i>BAX</i>	42
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL	45
4.2 METODOLOGIA.....	46
4.2.1 Extração de DNA	46
4.2.2 Tipagem do Gene <i>FAS</i>	48
4.2.3 Tipagem do Gene <i>BAX</i>	49
4.2.4 Hibridação de Oligonucleotídeos-Sonda para Discriminação Genotípica das Posições - 1377 e -670 do Gene <i>FAS</i> e -248 do Gene <i>BAX</i>	49
4.2.5 Tipagem do Gene <i>TP53</i>	52

4.2.6 Análise Estatística	55
5 RESULTADOS	58
5.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE <i>BAX</i> E PFE	58
5.2. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE <i>FAS</i> E PFE	58
5.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE <i>TP53</i> E PFE.....	60
5.4 POLIMORFISMO DOS GENES <i>FAS</i> , <i>BAX</i> E <i>TP53</i> NA POPULAÇÃO BRASILEIRA	63
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO.....	74
8 REFERÊNCIAS	75
9 ANEXOS	85
9.1 ANEXO 1 – TERMO DE ANUÊNCIA	85
9.2 ANEXO 2 – FICHA DE AVERIGUAÇÃO.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO DOS PRINCIPAIS POLIMORFISMOS DO GENE <i>TP53</i>	39
TABELA 2 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA O GENE <i>FAS</i>	49
TABELA 3 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA O GENE <i>BAX</i>	50
TABELA 4 - PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE SONDAS PARA OS GENES <i>BAX</i> E <i>FAS</i>	53
TABELA 5 - ESCORES UTILIZADOS PARA REGISTRO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR PCR-SSOP	53
TABELA 6 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O EXON 4 DO GENE <i>TP53</i>	53
TABELA 7 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA <i>TP53</i>	54
TABELA 8 - PROTOCOLO UTILIZADO NA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR DE <i>TP53</i>	54
TABELA 9 - DISPOSIÇÃO DOS DADOS PARA CÁLCULO DA OR	56
TABELA 10 - DADOS PARA ANÁLISE ESTRATIFICADA SEGUNDO SVEJGAARD E RYDER (1994)	56
TABELA 11 - COMPARAÇÕES EFETUADAS NA ANÁLISE ESTRATIFICADA DOS FATORES A E B	57
TABELA 12 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA A POSIÇÃO -248 DO GENE <i>BAX</i>	59
TABELA 13 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A POSIÇÃO -248 DO GENE <i>BAX</i>	59
TABELA 14 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO -248 DO GENE <i>BAX</i>	59
TABELA 15 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA AS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE <i>FAS</i>	61
TABELA 16 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA AS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE <i>FAS</i>	61
TABELA 17 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DAS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE <i>FAS</i>	62
TABELA 18 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DAS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE <i>FAS</i>	62
TABELA 19 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA A POSIÇÃO 12139 DO GENE <i>TP53</i>	62
TABELA 20 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A POSIÇÃO 12139 DO GENE <i>TP53</i>	62
TABELA 21 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO 12139 DO GENE <i>TP53</i>	63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UM DESMOSSOMA PROMOVENDO A ADESÃO ENTRE DOIS QUERATINÓCITOS.....	12
FIGURA 2 - MODELO PARA A VIA IMUNOPATOGENICA DE PFE.....	14
FIGURA 3 - PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DE PFE.....	15
FIGURA 4 - PRINCIPAIS VIAS APOPTÓTICAS.....	24
FIGURA 5 - FUNÇÕES DE FAS E FASL NA CO-ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS T.....	29
FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DOS 393 AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA p53.....	35
GRÁFICO 1 - OCUPAÇÃO DE PACIENTES E CONTROLES	47
GRÁFICO 2 - IDADE NA QUAL SE MANIFESTOU A LESÃO PRIMÁRIA	47
GRÁFICO 3 - REGIÃO DO PAÍS NA QUAL SE MANIFESTOU A LESÃO PRIMÁRIA	47
FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DO FRAGMENTO AMPLIFICADO E POSIÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A TIPAGEM DO GENE <i>FAS</i>	48
FIGURA 8 - SEQUÊNCIA DO FRAGMENTO AMPLIFICADO E POSIÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A TIPAGEM DO GENE <i>BAX</i>	50
FIGURA 9 - GENE <i>TP53</i> - FRAGMENTOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR COM A ENZIMA <i>BSED</i> I	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	– doença de Alzheimer
ALPS	– síndrome linfoproliferativa autoimune
APC	– célula apresentadora de antígeno
APO-1	– antígeno de apoptose 1 (FAS)
BAX	– proteína X associada ao Bcl
BCL-2	– linfoma de célula B do tipo 2
BIM	– proteína de interação com o Bcl-2
CTL	– linfócito T citotóxico
DR	– receptor da morte
DSG1	– desmogleína 1
EC5	– quinto domínio extracelular
FAS	– nome oficial TNFRSF6
FASL	– ligante de Fas
FS	– fogo selvagem
HLA	– antígeno leucocitário humano
IFI	– imunofluorescência indireta
IFN	– interferon
IDDM	– diabetes mellitus insulino-dependente (tipo I)
IGG	– imunoglobulina pertencente a classe G
IL	– interleucina
JCA	– artrite juvenil crônica
Kb	– quilobases
LFS	– síndrome de Li-Fraumeni
LLC	– leucemia linfocítica crônica
MHC (CPH)	– complexo principal de histocompatibilidade
MS	– esclerose múltipla
NK	– célula natural killer
OR	– razão de probabilidade

Pb	– pares de base
PCR	– reação em cadeia da polimerase
PFE	– pênfigo foliáceo endêmico
PV	– pênfigo vulgar
RA	– artrite reumatóide
RFLP	– polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
ROS	– radicais reativos de oxigênio
SLE	– lupus eritematoso sistêmico
SNP	– polimorfismo de nucleotídeo único
TH1 e TH2	– fenótipos dos linfócitos T auxiliares
TNF	– fator de necrose tumoral
TNFR	– receptor do fator de necrose tumoral
TP53	– proteína tumoral 53

RESUMO

Pênfigo foliáceo (PF) é uma doença auto-imune caracterizada por bolhas e erosões na pele e por auto-anticorpos patogênicos, com especificidade para moléculas da epiderme. Apresenta características epidemiológicas distintas em certas regiões do Brasil (onde também é conhecido como fogo selvagem) e em outros países da América do Sul, assim como na Tunísia, entre as quais a mais peculiar é a sua elevada prevalência. As causas do PF são ainda desconhecidas. Sabe-se que vários fatores estão envolvidos na sua patogênese, entre eles, fatores genéticos. O presente trabalho teve por objetivo analisar se variantes de genes de apoptose contribuem para a susceptibilidade ao PF, uma vez que alterações dos mecanismos da apoptose podem contribuir para o início de uma doença autoimune, através de falhas na eliminação de linfócitos autorreativos, ou então durante a fase efetora da doença, através de danos a tecidos-alvo. O receptor Fas (produto do gene *FAS*) é um agente indutor da apoptose ao interagir com seu ligante (FasL). O produto gênico de *TP53* tem importante papel na detecção de danos no material genético e indução da apoptose, caso o reparo desses danos não seja possível. Já a proteína codificada pelo gene *BAX*, é uma importante mediadora da apoptose por promover o aumento da permeabilidade das membranas da mitocôndria, permitindo a liberação do citocromo C e conseqüente ativação de caspases efetoras, que levarão à morte celular. Este estudo reuniu um total de 238 pacientes e 358 controles. A maioria dos pacientes foi recrutada em Campo Grande, MS. As tipagens foram realizadas através das técnicas PCR-RFLP ou PCR-SSOP. Não foram encontradas associações entre PF e os SNPs *FAS* -1377(G,A) e -670(G,A), *TP53* 12139(G,C) e *BAX* -248(G,A). As frequências alélicas dos SNPs analisados neste estudo foram: *BAX* -248*A 6,4% e 8,9%; *TP53* 12139*C 30,7% e 38,0%, em euro e afro-brasileiros, respectivamente. Para o gene *FAS* foi analisado apenas o subgrupo de euro-brasileiros e as frequências alélicas foram: *FAS* -1377*A 9,9% e *FAS* -670*A 44,9%. Foram realizadas análises de interação entre os SNPs dos genes *BAX*, *FAS* e *TP53* e também de cada um desses com os SNPs *IL4* -590 e *IL6* -174, além de *HLA-DRB1*, para os quais já haviam sido encontradas associações positivas ou negativas, em estudos realizados anteriormente por nosso grupo. As diferenças significantes entre pacientes e controles deveram-se, exclusivamente, às associações com variantes dos genes *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1*, estando em concordância com os resultados obtidos nos estudos anteriores. Por fim, os resultados deste estudo levam-nos a concluir que as variantes genéticas analisadas não alteram a funcionalidade dos produtos gênicos de forma a interferir no curso da doença.

1 INTRODUÇÃO

A genética começou a desenvolver-se com a redescoberta das Leis de Mendel, em 1900. A descoberta do material genético e a elucidação de sua estrutura, ocorrida meio século após, proporcionaram grande progresso nessa área do conhecimento. A partir da década de 1970, o avanço da tecnologia permitiu o desenvolvimento de novas técnicas de investigação genômica. A tecnologia do DNA recombinante, principalmente com o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) feita por Mullis em 1985, trouxe novas abordagens e aplicações em estudos populacionais e elucidação da base genética de doenças.

Genes responsáveis por muitas doenças de origem monogênica já foram identificados, permitindo algumas vezes o diagnóstico precoce destas anomalias e estratégias de tratamento. Porém, muitas doenças comuns na população são de caráter multifatorial, ou seja, muitos genes e fatores ambientais contribuem para a sua patogênese. Dentre essas pode-se citar: doenças neurodegenerativas (por exemplo, esclerose múltipla), da vida moderna (por exemplo, obesidade), doenças autoimunes (pênfigo foliáceo, lupus eritematoso sistêmico, diabetes, artrite reumatóide, por exemplo).

Uma forma de detectar genes envolvidos em doenças multifatoriais ocorre através de estudos caso-controle. Neste tipo de análise, um grupo de pacientes (não relacionados geneticamente) e um grupo de indivíduos controle, tem determinadas as suas frequências alélicas para genes candidatos. Diferenças significativas nessas frequências geram indícios de associação do gene à predisposição ou resistência à doença, bem como informam qual(is) alelo(s) estão associados a ela.

Neste trabalho, foi realizado um estudo utilizando um grupo de casos e um grupo de controles, para análise de associação entre a doença pênfigo foliáceo e genes envolvidos na apoptose. Esses grupos foram constituídos da maneira mais homogênea possível, levando em consideração o grupo étnico, estilo de vida e faixa etária.

Pênfigo foliáceo endêmico (PFE) é uma doença autoimune caracterizada por bolhas e erosões na pele, provocadas por auto-anticorpos patogênicos com

especificidade para moléculas componentes da epiderme. Apesar de possuir ocorrência mundial, é encontrada em maior frequência na América do Sul. Possui alta prevalência em várias áreas rurais do Brasil, onde casos familiares são mais frequentes. Acomete principalmente adultos jovens e crianças. O PFE é uma doença de causa ainda desconhecida. Sabe-se que vários fatores estão envolvidos na sua patogênese, entre eles fatores ambientais e genéticos.

A escolha dos genes candidatos a serem analisados, baseou-se no conhecimento da função do seu produto e no seu polimorfismo. O gene que codifica o receptor Fas (*FAS*), é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). Esse receptor é um agente indutor da apoptose ao interagir com seu ligante (FasL). O produto gênico de *TP53* tem importante papel na detecção de danos no material genético e indução da apoptose, caso o reparo não seja possível. Atua desta maneira como supressor tumoral. Já a proteína X associada ao Bcl-2, codificada pelo gene *BAX*, é um importante mediador da apoptose por antagonizar os efeitos da proteína antiapoptótica Bcl-2 e promover o aumento da permeabilidade das membranas da mitocôndria, permitindo a liberação do citocromo C e conseqüente ativação de caspases efectoras, que desencadearão o processo de morte celular.

Devido ao caráter multifatorial e complexo da predisposição ao pênfigo foliáceo, a elucidação de fatores que possam causar susceptibilidade ou proteção a esse distúrbio, contribuirá para o desenvolvimento de novas terapias, medidas preventivas, e até mesmo para a busca da cura da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS DE ETIOLOGIA COMPLEXA

Muitos genes que controlam doenças humanas têm sido identificados nas últimas décadas, contribuindo assim para avanços no esclarecimento de diversas patologias de padrão monogênico de herança. Dentre essas, podemos citar a hemofilia, fibrose cística, distrofia muscular de Duchenne e coreia de Huntington, por exemplo (PETRONIS, 2001). Avanços na caracterização de desordens de origem mendeliana têm sido feitos através do uso de ferramentas moleculares, como por exemplo, o polimorfismo de marcadores de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e microssatélites, que possibilitam a análise de ligação e mapeamento dos locos envolvidos. Outra técnica empregada é a clonagem posicional, que permite a identificação dos genes partindo-se de sua localização cromossômica, para posterior identificação das diferentes mutações contidas nestes locos (RISCH, 2000).

Porém há um outro grupo de doenças que não seguem os padrões mendelianos de herança, não podendo ser atribuídas a um único gene ou fator ambiental (KIBERSTIS e ROBERTS, 2002). São as doenças complexas ou multifatoriais, nas quais vários genes, cada um com seu conjunto de variação alélica, contribuem para a variabilidade total observada no traço fenotípico (RISCH, 2000). Sewall Wright, através do estudo da polidactilia em cobaias, foi o primeiro a supor a presença de um sistema poligênico de herança. Propôs então, o modelo de limiar crítico no qual efeitos aditivos dos genes que intervêm na formação desses caracteres resultarem em diferentes graus de susceptibilidade, com a existência de um limiar crítico, promovendo alterações da manifestação do fenótipo (*apud* BEIGUELMAN, 1995). CARTER (1965), passou a utilizar esse modelo para explicar a ocorrência de malformações congênitas, bem como para estimar o risco de recorrência destas.

As doenças de etiologia complexa surgem da ação combinada de genes, fatores ambientais e comportamentos de risco. Fazem parte desse grupo, a maioria das doenças autoimunes, mentais, neurodegenerativas, além de obesidade e hipertensão (KING e cols., 1992; KIBERSTIS e ROBERTS, 2002).

Ao contrário dos distúrbios cujo padrão de herança é monogênico, no qual o gene mutado em dose simples ou dupla é suficiente para o desenvolvimento da anomalia, a manifestação de doenças multifatoriais envolve o conceito de susceptibilidade genética. Neste caso, um indivíduo geneticamente susceptível pode vir a manifestar a doença ou não, dependendo da interação combinada do seu genótipo com a constelação de fatores de risco não genéticos (condições ambientais, idade, sexo, dieta alimentar, entre outros). A susceptibilidade genética, além de predispor o indivíduo à doença, pode contribuir para a evolução e gravidade do quadro clínico, bem como na resposta ao tratamento.

A análise de doenças complexas em gêmeos monozigóticos mostra uma maior concordância nestes em comparação a gêmeos dizigóticos, evidenciando a participação de um componente genético na etiologia das mesmas. Este também é demonstrado através do fenômeno de agregação familiar e diferenças de prevalência da patologia em diferentes grupos étnicos (BEIGUELMAN, 1995).

Estudos que buscam elucidar os fatores genéticos envolvidos na patogênese de uma doença complexa podem ser feitos através de duas abordagens diferentes: investigações familiares e análises populacionais.

Estudos em famílias podem ser realizados para análises de segregação e de ligação. Permitem identificar se, entre os vários fatores que participam da patogênese de uma doença, há ou não um componente genético implicado na sua causa. Os estudos de segregação requerem o recrutamento de famílias para montagem de heredogramas e permitem deduzir o padrão de herança de cada gene candidato para a doença e grau de penetrância da característica fenotípica referente a esse, porém não esclarecem a identidade dos genes envolvidos. Estudos de ligação analisam a segregação de um marcador genético com a doença em questão. Requerem um grande número de famílias com um ou mais indivíduos afetados, para que se possa estabelecer a ligação entre os genes envolvidos, inferindo a região na qual o suposto gene de susceptibilidade está localizado através de cálculos escores lod (*lod score*) para diversas hipóteses alternativas à hipótese nula (de ausência de recombinação), ou seja, para diferentes frequências de recombinação. Outra abordagem para a análise de

associação é feita através de estudos em irmãos afetados. Neste caso observa-se a distribuição de alelos ou haplótipos idênticos em pares de irmãos afetados. Esta análise não requer o conhecimento do modo de transmissão nem do grau de penetrância do traço genético em questão, não informando também sobre a taxa de recombinação entre locos (BEIGUELMAN, 1995).

Os estudos populacionais podem ser retrospectivos (dos efeitos para as causas) ou prospectivos. Os primeiros são conhecidos como estudos caso-controle, e comparam um grupo de pacientes e um grupo de indivíduos controle, todos não relacionados geneticamente entre si, em relação a genes candidatos analisados. Este tipo de abordagem requer um bom pareamento entre os grupos e o conhecimento prévio das características epidemiológicas da doença, para a seleção correta de controles. Permite identificar os fatores genéticos que diferem entre os dois grupos que estejam contribuindo para a resistência ou susceptibilidade, e quantificar o efeito desses fatores através da determinação do risco relativo. O segundo tipo de estudo consiste em observar a população-alvo por um certo período de tempo (geralmente longo), registrando e acompanhando todos os casos novos. Permite o estudo dos fatores causais da doença, realização do cálculo do risco relativo e estimativa da prevalência da doença, mas não são adequados para a análise de doenças raras.

A identificação de genes envolvidos em doenças complexas vem sendo intensificada atualmente (KIBERSTIS e ROBERTS, 2002). Posteriormente, espera-se que a análise integrada de variáveis genéticas juntamente com fatores ambientais possa levar à caracterização dos papéis de cada gene no desenvolvimento de doenças multifatoriais (WILLETT, 2002). Isso poderia contribuir para tratamentos profiláticos e de atenuação da doença.

2.2 AUTOIMUNIDADE E DOENÇAS AUTOIMUNES

Autoimunidade é a resposta do sistema imune contra componentes do próprio organismo. Em condições fisiológicas, os mecanismos de tolerância ao próprio protegem o indivíduo de linfócitos potencialmente autorreativos. Até 1960, acreditava-se que estes linfócitos eram eliminados durante o desenvolvimento, e que falhas nesse

processo levariam a autoimunidade. Porém, ao final da década de 70, uma série de experimentos revelou que nem todos os linfócitos B e T autorreativos são deletados durante sua maturação. Reações autoimunes desses linfócitos são evitadas em indivíduos saudáveis através da anergia ou supressão clonal. A quebra da homeostase leva à ativação de células B ou T autorreativas, gerando resposta humoral ou mediada por células contra antígenos próprios, desencadeando doenças autoimunes que podem ser sistêmica ou órgão-específica (KUBY, 1997).

As doenças autoimunes afetam de 5% a 7% da população mundial, podendo causar grave debilidade em seus portadores (KUBY, 1997). Nas doenças órgão-específicas, a resposta imune é direcionada especificamente contra um antígeno alvo localizado em um órgão. O autoantígeno é reconhecido por linfócitos B ou T, levando a uma resposta inflamatória ou lise celular no órgão-alvo. Conseqüentemente, a estrutura celular é substituída por tecido conjuntivo, prejudicando a função fisiológica do órgão (KUBY, 1997). Como exemplo de doenças autoimunes causadas por dano celular direto podemos citar: a tireoidite de Hashimoto, a anemia autoimune e o diabetes mellitus do tipo I. Já em patologias como a doença de Graves e miastenia grave, os anticorpos secretados agem como agonistas, ligando-se a receptores de hormônios, estimulando em demasia a atividade do órgão com conseqüente aumento no número de células. Em outras condições autoimunes, esses anticorpos podem agir como antagonistas, bloqueando a função do receptor, podendo levar à atrofia do órgão afetado.

Nas doenças autoimunes sistêmicas, as respostas imunes estão voltadas para antígenos-alvo localizados em vários tecidos e órgãos. Isto leva a lesões generalizadas causadas por células B e T hiperativadas. Constituem exemplos desse tipo de patologia o lupus eritematoso sistêmico, a esclerose múltipla e a artrite reumatóide (KUBY, 1997).

2.3 MECANISMOS DE AUTOIMUNIDADE

Vários estudos com modelos animais têm contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos de autoimunidade. Esta pode acontecer espontaneamente ou ser induzida experimentalmente. Em 1973, a imunização de coelhos com receptores de acetilcolina, levou ao rápido desenvolvimento de fraqueza muscular, similar àquela encontrada na miastenia grave (KUBY, 1997). Todos os modelos têm apontado o linfócito T CD4⁺ como o mediador primário de doenças autoimunes.

Vários modelos têm sido propostos para explicar os mecanismo de indução da autoimunidade por células T, porém, acredita-se que esta seja resultado de uma combinação de vários fatores. A indução da tolerância em células T autorreativas ocorre predominantemente durante o desenvolvimento embrionário. Neste processo, os antígenos próprios são apresentados aos timócitos imaturos. As células T responsivas a estes peptídeos sofrem seleção negativa. Antígenos seqüestrados, ou seja, aqueles que por alguma razão não foram apresentados às células T no timo, não induzirão tolerância ao próprio por esse mecanismo, passando a ser reconhecidos como auto-antígenos. As células autorreativas em anergia podem ainda exercer funções patológicas quando ativadas por células acessórias ou por escapar do controle pelas células T supressoras, resultando na quebra da tolerância periférica (KUBY, 1997; PARHAM, 2001).

Outro mecanismo proposto para a indução da autoimunidade é conhecido como mimetismo molecular. Neste fenômeno, determinantes antigênicos de patógenos são semelhantes ou idênticos a antígenos do hospedeiro, levando à inibição da resposta imune contra o parasita ou ainda, desencadeando uma reação cruzada, tendo como alvo proteínas próprias (KUBY, 1997).

A expressão inapropriada de moléculas MHC de classe II também é capaz de levar à autoimunidade. Células que sofreram algum tipo de agressão ou infecção desencadeiam um processo inflamatório com conseqüente aumento da expressão de interferon γ . Este fato leva a um aumento de expressão das moléculas MHC,

promovendo a ativação de um grande número de células T contra autoantígenos (KUBY, 1997).

2.4 PÊNFIGO FOLIÁCEO

2.4.1 Histórico e Aspectos Epidemiológicos

Pênfigo foliáceo (PF) é uma dermatose bolhosa autoimune, caracterizada pela presença de autoanticorpos antiepidérmicos que reconhecem uma glicoproteína componente do desmossoma conhecida como Dsg1 (JONES e cols., 1984). Sua causa é ainda desconhecida, sendo encontrado na forma esporádica ou endêmica. A primeira ocorre na América do Norte, Europa e em áreas não endêmicas da América do Sul. Na França, a incidência de casos é $1-2 \times 10^{-6}$ casos por ano, sendo 80% destes pênfigo vulgar. A proporção sexual de mulheres/homens afetados é 2:1 (BASTUJI-GARIN e cols., 1995). A forma endêmica é encontrada principalmente na América Latina (Brasil e Colômbia) e na Tunísia, e aparentemente difere da forma esporádica apenas pelas suas características epidemiológicas. É interessante notar que as características epidemiológicas da forma endêmica diferem, entre regiões. Na Tunísia a incidência é $6-7 \times 10^{-6}$ casos por ano, dos quais 61% são PF. A proporção sexual de mulheres:homens afetados é 4:1. A incidência de casos entre mulheres de 20-34 anos é 20×10^{-6} / ano (BASTUJI-GARIN e cols., 1995). No Brasil, atualmente, a incidência de casos é cerca de $25-35 \times 10^{-6}$ / ano, com proporção sexual de 1:1 (DIAZ e cols., 1989a).

As formas esporádica e endêmica possuem características clínicas, histológicas e imunológicas semelhantes. Devido a maior ocorrência de PF na América do Sul e, sobretudo, no Brasil, durante um certo tempo essa doença foi conhecida como pênfigo foliáceo sul-americano e pênfigo foliáceo brasileiro. A partir do final da década de 1980, a doença passou a ser chamada de pênfigo foliáceo endêmico (PFE). Essa designação reflete com mais precisão sua principal característica diferencial – a endemicidade (CAMPBELL e cols., 2001). Assim, o PFE é a única doença, das

conhecidas atualmente, que possui característica autoimune e, ao mesmo tempo, endêmica.

Também conhecido como fogo selvagem (FS), no Brasil, o PFE é endêmico em certos estados do Brasil como Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde mais de 15.000 casos foram registrados até 1982 (DIAZ e cols., 1989a). O primeiro caso documentado de FS no Brasil foi citado por Aranha Campos. Ele descreveu dois casos de FS que apareceram no interior de São Paulo na região de Franca na segunda metade do século 19 (HANS-FILHO e cols., 1999). Com o aumento significativo do número de casos de FS, pacientes não tinham onde serem hospitalizados. Foram construídos hospitais especializados que se dedicavam ao estudo e tratamento da doença, nos estados que apresentavam maior número de pacientes. O primeiro, Hospital Adhemar de Barros, foi inaugurado em 1940. Localizado em São Paulo (SP), dedicava-se especialmente a tratar e reabilitar pacientes, além de se dedicar à pesquisa da doença. Depois, foi criado o Hospital do Pênfigo de Goiânia (GO) em 1952, seguido pelo Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) (LOMBARDI e cols., 1992). Este último é o único centro de referência para o tratamento da doença atualmente, atendendo pacientes de vários estados brasileiros e de países vizinhos. Os demais hospitais expandiram suas funções com a diminuição da endemia a partir da década de 70.

O pênfigo foliáceo ocorre em regiões com altitude entre 500 a 800 metros, sendo extremamente raro nas regiões abaixo de 400 metros ou acima de 1000 metros (LOMBARDI e cols., 1992). Foi observado que a forma endêmica acomete principalmente adultos jovens e crianças, de qualquer etnia ou sexo, que vivam ou trabalhem em áreas rurais endêmicas do Brasil e principalmente, próximas a rios (CAMPBELL e cols., 2001).

Foi observada prevalência particularmente elevada em algumas tribos indígenas brasileiras, tais como Xavantes, Terenas, Kadiwéo, entre outras. MORAES e cols. (1997) encontraram 2,62% de prevalência da doença em uma tribo de índios Terena no Mato Grosso do Sul. Em Xavantes a prevalência é de 1,4% (HANS-FILHO e cols., 1996). Estes pacientes indígenas possuíam perfil semelhante ao de outros focos

endêmicos, tais como habitações humildes e rústicas, e poucos recursos sócio-econômicos. Porém este quadro encontrava-se agravado pelas características de vida dos índios, que necessitam do campo para sua subsistência, estando bastante expostos à incidência de raios ultravioleta (CAMPBELL e cols., 2001).

A partir da segunda metade da década de 1970, ocorreu redução da endemia, que praticamente desapareceu em focos importantes, como São Paulo e norte do Paraná. Na região Centro-Oeste ocorreu estabilização em níveis bem menos significativos. Iniciou-se a fase de declínio da endemia e estabilização de focos que se estende até hoje. CHIOSSI e cols. (2001) realizaram um levantamento do número de casos de PFE ocorridos entre 1973 e 1998 na região noroeste do estado de São Paulo, e verificaram que a incidência da doença é de 9,4 casos por ano, sendo 46,9% dos indivíduos afetados residentes em áreas rurais. Assim, a história epidemiológica do FS mostra ascensão seguida de queda da endemia, que segue trajetória coincidente com o desbravamento e ocupação de regiões do território brasileiro (CAMPBELL e cols., 2001).

2.4.2 Etiologia

Sua endemicidade tem gerado suspeitas de que algum fator ambiental esteja contribuindo para a patogênese da doença. As atenções se voltaram para a presença de mosquitos “borrachudos” nos focos da doença. Estes insetos hematófagos, pertencentes a família Simuliidae, vêm promovendo discussões desde a década de 40, de que o fator desencadeante do pênfigo possa ser um vírus ou alguma substância salivar do animal, transmitida durante a picada (DIAZ e cols., 1989b; LOMBARDI e cols., 1992). Um estudo caso-controle epidemiológico comparou um grupo de 52 pacientes com FS com um outro grupo de 52 pacientes portadores de outras dermatoses, e através de questionários, foi realizado um levantamento dos fatores de riscos ambientais aos quais estes pacientes foram expostos durante um período de cinco anos. O único fator de risco que apresentou OR estatisticamente diferente de um foi a picada de simulídeos (OR= 4,7; $P < 0,001$) (LOMBARDI e cols., 1992). Um

levantamento realizado em 1998, na reserva de Limão Verde (MS) e áreas vizinhas, caracterizou a distribuição de nove espécies de *Simulium* em regiões que possuem ou não focos da doença. Apenas a espécie *Simulium nigrimanum* apresenta habitat coincidente com as áreas endêmicas, estando em maior abundância quando comparada com as outras espécies residentes nessas mesmas áreas (EATON e cols., 1998).

Outros aspectos exógenos, tais como fatores nutricionais e ambientais propriamente ditos podem estar contribuindo para a etiologia da doença. Foi proposto que o grupo tiol, presente em alimentos e na água, poderia ser um dos fatores desencadeante do pênfigo (BRENNER e WOLF, 1994 ; *apud* PAVONI, 2000). O tiol pode ser encontrado em alimentos tais como o alho, a cebola e o alho-poró. O fenol, presente em alimentos como a manga, a castanha de caju, a mandioca e o guaraná, também foi apontado por TUR e BRENNER (1997, 1998) como candidato a contribuir para a indução do pênfigo. A análise da água consumida nas regiões endêmicas indicou a presença de taninos (polifenóis). Quando ocorrem cheias, o tanino das regiões ribeirinhas estaria sendo lixiviado. BRENNER (1999) propôs que a exposição combinada a todos esses agentes poderia estar influenciando na indução à doença.

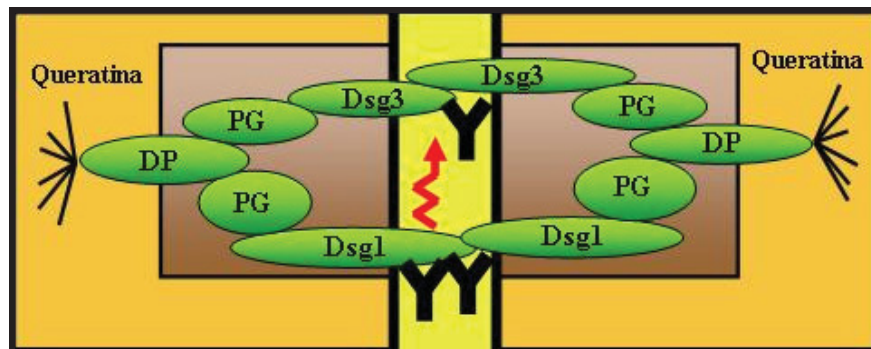
Além das variáveis ambientais descritas acima, vários outros fatores podem estar envolvidos na patogênese da doença. Nem todos os indivíduos de uma região endêmica desenvolvem o pênfigo foliáceo, levantando-se a hipótese de que a doença possa estar relacionada a uma combinação de fatores incomuns, que ainda podem estar ocorrendo em baixa frequência no meio. Sugere-se a existência de fatores endógenos, inclusive genéticos. Sabe-se que o genótipo é importante na susceptibilidade à maioria das doenças autoimunes. No caso de pênfigo, verifica-se isso através da alta frequência de casos da doença entre indivíduos da mesma família que apresentem vínculo genético entre si.

O FS é provocado por auto-anticorpos específicos para a epiderme, responsáveis pelo fenômeno de acantólise. No pênfigo foliáceo, a acantólise ocorre nas células epidérmicas mais superficiais (camada subcórnea), com o envolvimento raro de mucosas (COUNTER, 1959). A acantólise implica a dissolução ou lise das junções intercelulares do epitélio escamoso. As células epiteliais, sem as junções que as

mantinham unidas, perdem sua forma poliédrica, tornando-se arredondadas. O espaço formado entre as células provoca a formação de bolhas intraepidérmicas.

O soro de pacientes com pênfigo foliáceo contém auto-anticorpos do tipo imunoglobulina G (IgG). Podem ser detectados no soro pela técnica da imunofluorescência indireta (IFI), e seus níveis correlacionam-se com a extensão e atividade da doença. Estes auto-anticorpos do FS reagem contra uma glicoproteína de superfície, sintetizada pelos queratinócitos, denominada desmogleína 1 (Dsg1). Esta é uma glicoproteína transmembrânica, com uma região intracelular e outra extracelular (Figura 1). Pertence à família das caderinas, tendo importante função no processo de adesão celular (CAMPBELL e cols., 2001). Indivíduos doentes perdem a tolerância a esse antígeno epidérmico.

FIGURA 1 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UM DESMOSSOMA PROMOVENDO A ADESÃO ENTRE DOIS QUERATINÓCITOS. DSG1 E DSG3 SÃO ANTÍGENOS-ALVO DO PF E PV, RESPECTIVAMENTE. PG: PLACOGLOBINA; DP: DESMOPLAQUINA



HERTL e cols., 2003

Outro fenômeno que poderia promover o processo acantolítico não seria necessariamente resultante da lesão induzida por anticorpos. Nesse modelo o complexo antígeno-anticorpo induziria a produção e liberação de uma enzima proteolítica (serina-protease) pelos queratinócitos. Esta enzima agiria como ativadora do plasminogênio, levando à produção de plasmina, responsável pela acantólise. Outras substâncias antigênicas que pudessem ser fatores desencadeantes desse processo continuam sendo alvo de investigações (CAMPBELL e cols., 2001).

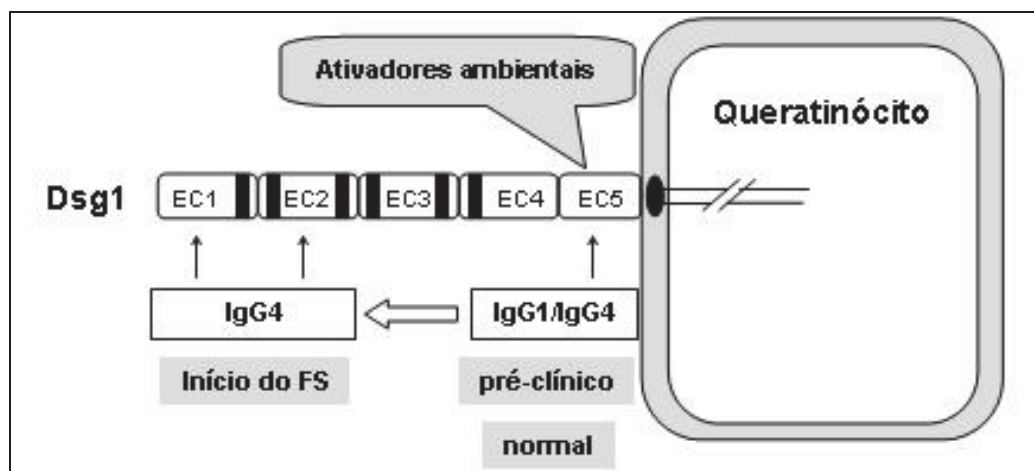
LI e cols. (2003) mostraram em estudo recente, a relação entre o espalhamento intramolecular de epítomos e a manifestação clínica de PFE em uma comunidade brasileira (reserva de Limão Verde, MS) com altos índices de incidência e prevalência da doença. A partir da observação de que tanto pacientes com PFE e pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos, além de indivíduos sadios possuem anticorpos contra epítomos do quinto domínio extracelular da Dsg1 (EC5), sendo que estes últimos não apresentam lesões epidérmicas, foi proposto um modelo imunopatogênico para o PFE. Primeiramente, a produção de anticorpos anti-EC5 seria desencadeada por reação cruzada de antígeno(s) exógenos que apresentam homologia de sequência com o domínio EC5 de Dsg1. Pacientes com PFE em estágios pré-clínicos, indivíduos sadios e os demais pacientes com oncocercose, doença de Chagas e leishmaniose, desenvolveriam uma resposta humoral (IgG1 e IgG4) inicial não-patogênica contra o domínio EC5, a partir do contato com o fator ambiental. Este domínio possui tamanho reduzido e está localizado próximo a membrana, podendo ser críptico, ou seja, seqüestrado *in vivo*, sendo incapaz de ser ligado por anticorpos anti-EC5 circulantes. Em um segundo estágio, indivíduos geneticamente susceptíveis desenvolveriam a manifestação clínica de PFE, através de um fenômeno denominado espalhamento intramolecular de epítomos, produzindo anticorpos patogênicos (IgG4) contra o primeiro (EC1) e o segundo (EC2) domínios (amino-terminais) extracelulares da Dsg1 (Figura 2). Estes domínios estão envolvidos na atividade de adesão promovida pela desmogleína e sua ligação a anticorpos interfere na função da glicoproteína. Pacientes em fase de remissão da doença apresentam apenas anticorpos contra o domínio EC5, evidenciando dessa maneira, que o espalhamento intramolecular de epítomos pode modular estágios de remissão e recaída do FS.

2.4.3 Quadro Clínico e Classificação

As lesões cutâneas primárias são bolhas superficiais que se rompem facilmente. Essas podem encontrar-se transformadas em discretas erosões, escama fina e aderente ou em pequena crosta hemorrágica. É bastante comum o líquido da bolha

conter bactérias que, com o rompimento e ressecamento, deixam escamas e crostas amareladas. As lesões iniciam-se de forma branda, pela cabeça, seguindo pelo pescoço, espalhando-se em seguida pelo corpo todo após algumas semanas ou meses. Na maioria dos pacientes, as lesões concentram-se principalmente em regiões da pele expostas ao sol. Face e couro cabeludos são locais sempre acometidos no FS. Raramente o pênfigo foliáceo é agudo e fulminante, com disseminação das lesões em uma a três semanas (HANS-FILHO e cols., 1999).

FIGURA 2 - MODELO PARA A VIA IMUNOPATOGÊNICA DE PFE



LI e cols., 2003

Clinicamente, há três formas de pênfigo foliáceo: a forma localizada (forma frustra), a generalizada e a hiperpigmentada (DIAZ e cols., 1989a; HANS-FILHO e cols., 1999, CAMPBELL e cols., 2001).

Pacientes que apresentam a forma localizada, possuem lesões, na maioria das vezes, limitadas às áreas seborréicas da pele. Essas lesões são vesículas e pequenas bolhas que se rompem rapidamente, deixando áreas erosivas secundárias e crostas, podendo também ser eritematosas, violáceas ou pápulas hiperpigmentadas. A maioria dos pacientes permanece com essas lesões estabilizadas. Alguns porém, podem apresentar disseminação das lesões para o tronco, abdômen e membros superiores e inferiores, evoluindo para a forma generalizada (CAMPBELL e cols., 2001).

A forma generalizada (Figura 3) possui três tipos clínicos distintos. O primeiro é uma forma bolhosa-esfoliativa, e se manifesta em pacientes na fase aguda da doença.

Pacientes nessa forma clínica podem desenvolver erupção variceliforme de Kaposi se expostos ao vírus da herpes. O segundo inclui pacientes que desenvolvem eritroderma esfoliativo. Já a terceira forma inclui pacientes que manifestam placas ceratóticas generalizadas e lesões nodulares.

FIGURA 3 - PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DE PFE



Ao contrário das demais, a forma hiperpigmentada está associada à remissão da doença. Pode-se restringir a áreas de lesões prévias, ou ser difusa e envolver regiões não afetadas anteriormente. Antes do estabelecimento de tratamento com esteróides, essa característica era conhecida como aurora da cura, alterando a coloração da pele dos pacientes, onde caucasóides se pareciam com mulatos, estes tornavam-se negros e os negros adquiriam uma coloração de pele cinza-azulada (CAMPBELL e cols., 2001).

2.4.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico é realizado baseado em sintomas clínicos, por um especialista na área de dermatologia. O exame histológico permite a detecção da acantólise. Algumas bolhas intra-epidérmicas podem apresentar espongiose e estar repletas de neutrófilos e eosinófilos (CAMPBELL e cols., 2001). Uma das formas de diferenciação entre FS e PV é através da observação da ausência de lesões orais em

FS. A imunofluorescência indireta (IFI) revela auto-anticorpos de FS em níveis distintos que podem ser associados com a atividade da doença.

A doença é tratada basicamente com glicocorticóides por via oral, sendo prednisona a droga mais comumente administrada aos pacientes (dose diária: 1 a 2 mg/kg). A dose deve ser reduzida a cada semana, a partir de indícios de melhoria clínica. Caso ocorra infecção bacteriana secundária, antibióticos sistêmicos devem ser administrados. Localmente, banhos de permanganato de potássio na diluição de 1/40.000 podem ajudar na cicatrização e amenizar a sensação de ardência nos locais das lesões (HARMAN e BLACK, 1999; CAMPBELL e cols., 2001).

2.4.5 Aspectos Genéticos

O componente genético pode ser verificado no PFE, através da análise da frequência mais elevada dessa doença em indivíduos geneticamente relacionados do que entre indivíduos sem consangüinidade entre si. Em 1942, Aranha-Campos (*apud* MINELLI, 1986) estudou 604 pacientes dos quais 161 tinham mais de um membro afetado na família. Das 514 famílias, 443 tinham apenas um membro afetado, enquanto 71 apresentavam mais de um membro afetado. Uma vez que o risco para consangüíneos é muito inferior a proporção esperada pelos padrões simples de herança, acredita-se que vários genes estejam contribuindo para a susceptibilidade da doença.

Vários estudos envolvendo genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) têm mostrado forte associação de alelos HLA com doenças autoimunes e, em particular, com os pênfigos vulgar e foliáceo.

PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989) demonstraram que dois dos genes envolvidos na susceptibilidade ao PFE são HLA-DR e HLA-DQ, através de estudo realizado em uma população caucasóide sul-brasileira. Foram detectadas associações positivas entre pênfigo foliáceo e DR1, com risco relativo (RR) 6,4, e DR4 (RR=3,3), e associações negativas com DR7 (RR=0,06) e DQ2 (RR=0,27). Concluíram que os haplótipos DR1-DQw1 e DR4-DQw3 são marcadores de susceptibilidade para FS,

enquanto DR7-DQw2 e DR3-DQw2 são marcadores para resistência aumentada contra FS. Foi detectada a ausência de associação com os genes HLA-A, *B e *C. Estes resultados mostram que os pacientes com a doença tendem a compartilhar alelos HLA de classe II específicos.

MORAES e cols. (1991) detectaram uma associação positiva com DRB1*0102 (RR=7,3), pertencente ao grupo sorológico DR1 e uma associação negativa com DQB1*0201 (grupo sorológico DQw2) ao estudarem 38 pacientes com FS e 50 controles, todos provenientes de áreas endêmicas. Estes resultados corroboram as associações encontradas por PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989). O alelo de susceptibilidade encontrado nesse estudo difere de DRB1*0101 nas posições que codificam os aminoácidos 85 e 86, concluindo aqueles autores que estes aminoácidos possam estar envolvidos na formação de um epítipo funcional que permitiria o reconhecimento pelas células T, determinando conseqüentemente a predisposição à doença.

Através da análise de 10 pacientes e 74 controles sadios da tribo indígena Xavante, CERNA e cols. (1993), encontraram associação positiva entre FS e DRB1*0404 (RR=9,6). Todos os pacientes possuíam esse alelo ou DRB1*1402, porém este último não mostrou diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles.

MORAES e cols. (1997), confirmaram essa associação com DRB1*0404, através da análise de HLA-DRB1 em uma população de índios Terena (MS). Aumentos não significativos de DRB1*1402 e DRB1*1406 também foram observados nesse estudo. Segundo eles, os polipeptídeos codificados por estes alelos compartilham uma seqüência de aminoácidos (“epítipo”) nas posições 67-74, localizadas na terceira região hipervariável da molécula: LLEQRRAA, propondo que alelos cuja seqüência nucleotídica codifique esta seqüência de aminoácidos predispõe ao PFE. Nesse caso, variantes alélicas de genes do sistema HLA de indivíduos expostos aos possíveis agentes etiológicos, ainda não definidos, desencadearão ou não a formação de auto-anticorpos contra antígenos epidérmicos, de acordo com sua capacidade relativa de conferirem susceptibilidade ou resistência à doença (CAMPBELL e cols., 2001).

PAVONI e cols. (2003) encontraram associação positiva com PFE para os alelos DRB1*0101, *0102, *0103, *0404, *0406, *0410, *1406 e *1601, e associação negativa para DRB1*0301, *0701, *0801, *1101, *1104 e *1402, ao analisar 147 pacientes e 182 indivíduos controles. Através da análise das diferentes combinações genóticas foi demonstrado que a interação entre alelos de resistência, susceptibilidade e neutros desviam-se claramente do modelo co-dominante. Possíveis discrepâncias entre os alelos associados ao PFE nos diferentes estudos podem ser atribuídas à composição étnica diferente das populações analisadas, que podem diferir no repertório e frequência dos alelos de cada loco HLA. Apesar de alelos que compartilham o motivo LLEQRRAA também estarem associados à doença neste estudo, outros que não possuem esta sequência foram igualmente associados, evidenciando que outras características das moléculas HLA também são importantes no mecanismo de autoimunidade.

Outros estudos buscaram verificar se variantes polimórficas do gene *DSG1* que estão envolvidas nos mecanismos de susceptibilidade ao PFE, uma vez que este gene codifica a desmogleína 1, principal antígeno-alvo nesta doença. MARTEL e cols. (2002) identificaram um SNP (C, T) na posição 809, localizada na região que codifica para o segundo domínio extracelular da Dsg1. Posteriormente, analisaram esse polimorfismo juntamente com genes MHC de classe II, em busca de possíveis interações genéticas complexas. O estudo, realizado em 31 pacientes e 84 controles sadios, da população francesa, consistiu na análise combinada do polimorfismo de genes HLA de classe II e *DSG1*, e com base nos resultados os autores sugeriram que a interação entre o alelo *DRB*04* e o genótipo C/C de *DSG1* confere uma susceptibilidade maior ao FS. Sendo assim, os autores sugeriram epistasia entre genes individuais na susceptibilidade ao FS, e ilustrando mais uma vez a complexidade genética de doenças autoimunes órgão-específicas. FERREIRA (2003) analisou as posições 809 e 1660 do gene *DSG1* em pacientes com PFE e controles da mesma amostra populacional do presente trabalho. Não foram encontradas associações positivas ou negativas com a doença. As frequências populacionais foram:

*DSG1*809C*: 63,8%, *DSG1*809T* 36,2%, *DSG1*1660A*: 90,3% e *DSG1*1660C*: 9,7%.

PEREIRA e cols. (2004) realizaram um estudo de associação entre os polimorfismos das posições -590 do gene *IL4* e -174 do gene *IL6* e PFE. A amostra foi composta por 168 pacientes e 189 controles de brasileiros mestiços, de uma população brasileira de origem predominantemente européia (a mesma analisada em nosso estudo). Foi encontrada uma associação positiva com o genótipo T/T de *IL4* -590 (OR=2,71; $P=0,00461$) e uma associação negativa com a variante C (OR=0,37; $P=0,00446$). Associações com variantes *IL6* - 174 sugerem que o genótipo C/C exerce um efeito protetor (OR=0,13; $P=0,00202$) enquanto os indivíduos portadores do alelo G possuem maior susceptibilidade ao PFE (OR=7,66; $P=0,00190$). ROXO e cols. (2003) analisaram SNPs dos genes *TNF* e *LTA* nessa mesma população. Através dos resultados obtidos foi encontrada uma associação negativa, próxima ao limiar de significância, com a variante *TNF*238A* (OR=0,47; $P=0,049$). Já para os SNPs 249, 365 e 720 do gene *LTA*, não foram encontradas associações desse com PFE.

Como visto acima, vários estudos mostraram associações positivas e negativas ou ausência de associação entre variantes de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade e pênfigo foliáceo. Porém, essa doença possui caráter poligênico, e pouco se sabe sobre outros genes que possam estar envolvidos em sua patogênese. O estudo de outros genes candidatos, selecionados a partir de sua possível relação funcional com os mecanismos efetores que desencadeiam o pênfigo foliáceo, se fazem necessários na busca de uma melhor compreensão e caracterização desta doença.

2.5 APOPTOSE

2.5.1 Aspectos Gerais

A eliminação de células é essencial para o processo de embriogênese (formação de dedos, regressão dos dutos de Müller e Wolf, por exemplo), no período pós-embrionário, na metamorfose (regressão da cauda de animais, por exemplo) e na

renovação tecidual, bem como para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune, agindo na regulação da resposta imune. A homeostase de um ser vivo está fortemente regulada, não somente pela diferenciação e proliferação de células, mas também pela morte celular, que ocorre muitas vezes através da apoptose, uma forma programada de morte celular.

Podemos diferenciar apoptose de necrose, pois esta é morfologicamente distinta da primeira, sendo uma forma patológica de morte celular na qual o conteúdo intracelular é liberado no meio após o rompimento da membrana plasmática. É causada por agentes físicos e químicos, tais como infecções virais e toxinas.

Na apoptose, ocorre a destruição ordenada da célula. Primeiro, há condensação do citoplasma, enquanto o núcleo, além de se condensar, tem o DNA fragmentado em pedaços menores chamados oligômeros. No estágio final desse processo, as células se fragmentam por inteiro, e seus produtos são empacotados formando os chamados “corpos apoptóticos”, que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por células do sistema retículo-endotelial (SIEGEL e cols., 1999).

Mecanismos fisiológicos de morte celular são utilizados pelos organismos multicelulares para o desenvolvimento e morfogênese, além do controle do número de células. A apoptose também é utilizada como estratégia de defesa, removendo células infectadas, mutadas ou que sofreram danos (VAUX e cols., 1999).

A morte celular é considerada fisiológica quando programada pelas próprias células que constituem o organismo. A grande maioria destas está destinada a ser eliminada por este mecanismo. Apenas uma pequena parcela morre devido à injúria ou incapacidade de sustentar sua própria viabilidade.

2.5.2 Papel da Apoptose no Desenvolvimento e na Defesa Contra Patógenos

A maioria das células produzidas durante o desenvolvimento embrionário em mamíferos sofre apoptose antes do término do período perinatal (VAUX e cols., 1999). Este processo se inicia já na formação das camadas internas e externas do blastocisto, envolvendo também a formação de tubos neurais, a separação de dígitos e

remodelamento de ossos. No sistema hematopoiético, o processo está envolvido na eliminação de células em excesso. Já no timo age na seleção negativa de timócitos, eliminando aqueles cujos receptores reconhecem antígenos próprios (NOSSAL e cols., 1994). Nos indivíduos adultos, a homeostase é mantida pelo equilíbrio entre mitose e apoptose. A morte celular também está envolvida nos processos de metamorfose em insetos, anfíbios e mamíferos.

Plantas e metazoários utilizam-se desse processo de morte celular também para defesa. Os vírus necessitam da maquinaria celular para se replicar. A eliminação da célula hospedeira logo no início da infecção viral limita sua replicação e proliferação, o que levaria a maiores prejuízos. Porém, à medida que o organismo desenvolve mecanismos de morte celular para estes fins, os vírus desenvolvem novas estratégias para a sua sobrevivência. Estudos em insetos e vertebrados têm revelado que estes parasitas possuem inibidores para muitas etapas da apoptose. Entre estes encontram-se moléculas homólogas à Bcl-2 (inibidores diretos das caspases ativadoras) e inibidores da proteína tumoral p53 (VAUX e cols., 1999).

Portanto, a morte celular fisiológica é um processo de fundamental importância para a preservação da homeostase do organismo, podendo ser originária de mecanismo de defesa contra parasitas intracelulares. Muitos genes envolvidos no processo apoptótico encontram-se conservados entre diferentes organismos, mas as vias pelas quais essa sinalização ocorre ainda não foram bem compreendidas.

2.5.3 A Participação de Genes de Apoptose na Autoimunidade

Deficiências no mecanismo de apoptose podem contribuir para o início de uma doença autoimune, através da falha da seleção negativa de linfócitos autorreativos, ou na fase efetora da doença, através de danos a tecidos-alvo. Porém, a ativação em excesso ou supressão da apoptose pode também ser uma consequência do processo de autoimunidade.

O número de células no sistema imune é controlado através do equilíbrio entre mitose e apoptose, sendo regulado por fatores de crescimento, hormônios e citocinas,

durante cada estágio do desenvolvimento do sistema imune (VAUX e cols., 2000). Linfócitos que falharam ao rearranjar seus receptores antigênicos são eliminados. O mesmo ocorre com timócitos que falharam no reconhecimento ao MHC próprio (seleção positiva), ou que reconheceram fortemente antígenos próprios (seleção negativa) (NOSSAL e cols., 1994). A apoptose também é importante na eliminação das células efectoras após o término da resposta imune.

Células do sistema imune podem influenciar a sobrevivência uma das outras, bem como de outros tipos de células, através da liberação de citocinas que promovem a persistência (por exemplo, interleucina 2) ou a morte celular (por exemplo, membros da superfamília do fator de necrose tumoral ou interferon gama). Linfócitos T citotóxicos e células *natural killer* (NK) podem eliminar-se, bem como eliminar células infectadas, pela indução da apoptose pela exocitose de grânulos ou através da liberação de ligantes do receptor do fator de necrose tumoral (KAGI e cols., 1994). Em doenças autoimunes, células somáticas podem ser alvo de apoptose causada direta ou indiretamente por células do sistema imune.

Evidências genéticas têm sugerido que falhas em genes de apoptose podem levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Como exemplo, temos a síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), na qual mutações no gene *FAS* e em alguns casos, no gene da caspase 10 impedem a transdução do sinal pela via apoptótica, inibindo a eliminação de linfócitos (VAUX e cols., 2000).

A deleção de genes que controlam algumas vias de morte celular pode causar síndromes semelhantes ao lupus. A proteína proapoptótica Bim, promove apoptose ao se ligar em receptores, antagonizando membros da família Bcl-2, que são moléculas antiapoptóticas. Em camundongos *Bim* ^{-/-}, plasmócitos não são eliminados, provocando o desenvolvimento de uma doença autoimune renal (VAUX e cols., 2000).

WANG e cols. (2004) identificaram a presença do processo apoptótico em queratinócitos de tecidos lesional e peri-lesional de pacientes com pênfigo vulgar, sendo induzido antes mesmo da perda da adesão entre as células. Também sugerem que a apoptose poderia ser a causa do fenômeno acantolítico. Através de ensaios *in vitro* demonstraram que anticorpos IgG específicos para Dsg3 juntamente com um

anticorpo contra o receptor Fas induziram a formação de lesões similares às aquelas observadas *in vivo*. Foi observado também a secreção de FasL, aumento na quantidade do receptor Fas, da forma ligada a membrana de FasL e das proteínas Bax, p53 e caspase 8, além da diminuição dos níveis celulares de Bcl-2 e ativação das caspases efetoras 1 e 3. Essas evidências sugerem que a acantólise induzida por PV-IgG pode ocorrer através da via apoptótica, abrindo novas perspectivas a respeito dos possíveis mecanismos envolvidos na indução do dano tecidual em doenças autoimunes.

2.5.4 Mecanismos de Apoptose

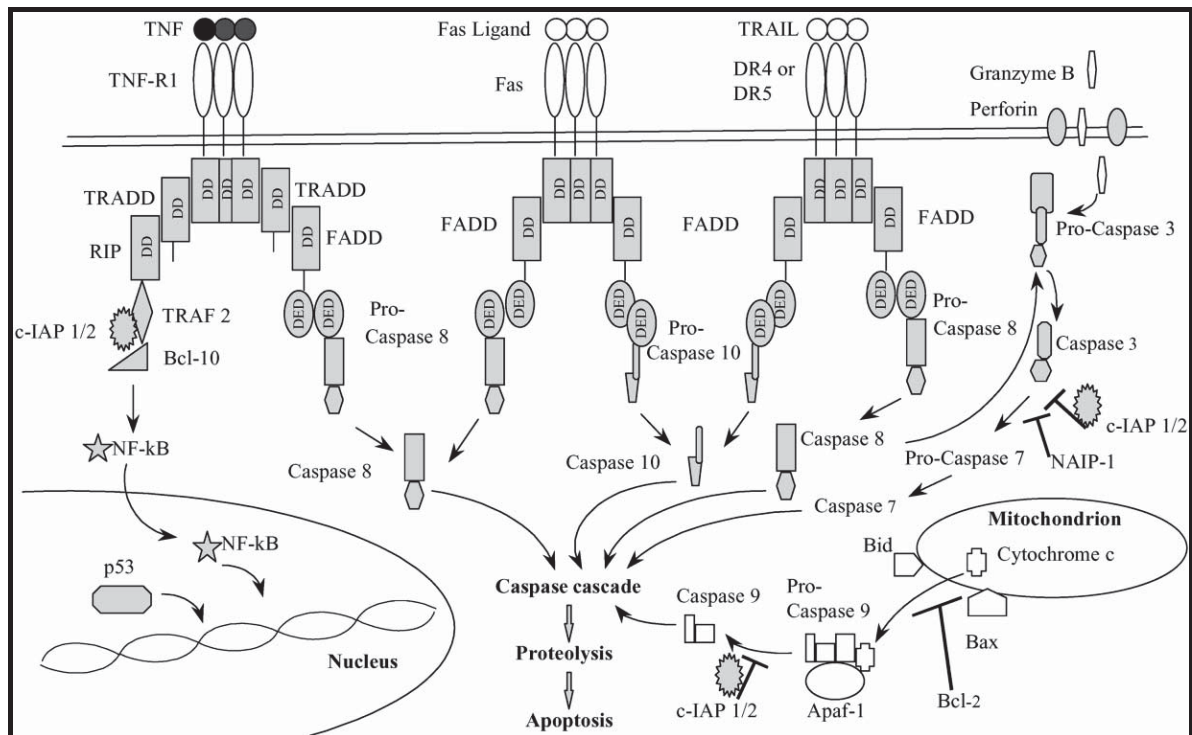
A apoptose exibe características morfológicas e alterações bioquímicas distintas, dependendo da via pela qual ocorre (Figura 4).

O principal caminho de apoptose envolve os receptores de morte (DR) localizados na superfície celular. Os DR transmitem um sinal de apoptose ao interagir com ligantes específicos. A maior família conhecida desses receptores está representada pela superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFRs). Dentre esses, os melhores caracterizados são: TNFR1, Fas, TNFR2, DR4 e DR5. Os ligantes que ativam esses receptores possuem, na sua maioria, semelhanças estruturais, tendo homologia com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Após a interação ligante/receptor, este último interage com um domínio homólogo (domínio da morte) de uma proteína adaptadora intracelular, que recruta proteases específicas conhecidas como caspases. Após sua ativação, estas enzimas iniciam uma cascata de reações que culminam com a degradação de proteínas citoplasmáticas e o DNA, levando conseqüentemente, à morte celular (KUMAR e cols., 1999; SLEE e cols., 1999; MÜLLAUER e cols., 2001).

Um segundo mecanismo de apoptose ocorre através da mitocôndria, envolvendo o citocromo C. Este se desprende da organela em resposta a danos sofridos pela célula, ligando-se à molécula adaptadora Apaf-1, que então recruta a pro-caspase 9, que se torna ativada por autoprocessamento. Uma vez ativada, a caspase 9 desencadeia uma cascata de ativação de caspases, que leva a degradação do conteúdo

celular. Membros da família Bcl-2 estão envolvidos na regulação da morte celular via mitocôndria. As moléculas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl impedem a liberação do citocromo c da organela. Em contrapartida, membros pró-apoptóticos como o Bax, antagonizam o efeito dessas moléculas permitindo a formação de poros na membrana externa da mitocôndria, facilitando a liberação do citocromo C (YANG e cols., 1997; SCHENDEL e cols., 1998; MÜLLAUER e cols., 2001).

FIGURA 4 - PRINCIPAIS VIAS APOPTÓTICAS



MÜLLAUER e cols., 2001

Há ainda um terceiro mecanismo que não envolve nem DRs nem a mitocôndria, estando relacionado à ativação da proteína nuclear p53 em resposta a danos no material genético. Esta proteína retarda a passagem da célula da fase G1 à fase S do ciclo celular, até que haja o reparo no DNA. Se o dano for grave, e também, dependendo do tipo celular e dos oncogenes presentes, a molécula p53 inicia a apoptose, através da ativação de genes pró-apoptóticos e genes cujos produtos liberam oxigênio reativo (POLYAK e cols., 1997; MÜLLAUER e cols., 2001).

A desregulação dos mecanismos de apoptose tem implicações na patogênese de várias doenças humanas. Algumas dessas são causadas por defeitos em genes de apoptose. A identificação de mutações nesses genes pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos dos quais as moléculas envolvidas participam. A partir do conhecimento da natureza molecular dos defeitos apoptóticos, pode-se desenvolver marcadores para diagnóstico de doenças e novas formas de tratamento.

2.6 O RECEPTOR APOPTÓTICO FAS E SEU LIGANTE (FasL)

2.6.1 Histórico e Caracterização dos Genes *FAS* e *FASL*

Em 1989, dois grupos de pesquisadores, de forma independente, isolaram anticorpos que possuíam ação citolítica frente a diversas linhagens celulares humanas (TRAUTH e cols., 1989; YONEHARA e cols., 1989; *apud* NAGATA e GOLSTEIN, 1995). As proteínas reconhecidas por estes anticorpos foram denominadas Fas e Apo-1, respectivamente. Enquanto a proteína Fas foi reconhecida por IgM, Apo-1 foi reconhecida por anticorpos da sub-classe IgG3. Em 1991, ITOH e cols. clonaram o DNAc a partir de células humanas e de camundongo. Posteriormente, foi observado que células murinas transformadas que expressavam constitutivamente o gene *FAS* sofriam apoptose ao serem tratadas com anticorpos específicos, indicando a participação desta molécula na transdução de sinais apoptóticos. A subsequente purificação e clonagem do gene *APO-1* levou à conclusão que este e *FAS* eram idênticos, tratando-se de um único gene (NAGATA e GOLSTEIN, 1995).

O gene *FAS* foi mapeado por hibridação *in situ* em 10q24.1 (INAZAWA e cols., 1992). No camundongo, seu homólogo está localizado no cromossomo 19, tendo cerca de 58,5% de identidade de sequência nucleotídica (WATANABE-FUKUNAGA e cols., 1992). Ambos são compostos por nove exons, porém o gene humano se estende por 25 kb, enquanto o murino possui mais de 70 kb.

O gene *FAS* humano possui nove exons e oito introns. O exon 1 representa a região 5' não traduzida e o DNA que codifica os 10 primeiros aminoácidos da

seqüência sinalizadora. A região extracelular da molécula consiste de três domínios ricos em cisteína e é codificada pelos exons 2, 3, 4 e 5. O exon 6 codifica a região transmembrânica. Os exons 7 e 8 codificam a porção citoplasmática próxima à membrana, composta por 36 aminoácidos. Os demais aminoácidos que compõem a região citoplasmática (incluindo o domínio da morte) são codificados pelo exon 9, que inclui ainda a região 3' não traduzida (BERHMANN e cols., 1994). A região 5' do gene é rica em GC e carece de uma seqüência consenso do tipo TATA box (WATANABE-FUKUNAGA e cols., 1992).

SUDA e cols. (1993), identificaram uma molécula que desencadeia o processo de apoptose ao se ligar ao produto gênico de *FAS*, um receptor de membrana celular. Em 1994, TAKAHASHI e cols. isolaram o gene *FASL* de murinos por retrocruzamentos interespecíficos e o localizaram no cromossomo 1, na mesma região ocupada por um mutante conhecido por *gld*, responsável pela síndrome linfoproliferativa generalizada. Logo em seguida, esse mesmo grupo de pesquisadores mapeou o gene *FASL* humano no cromossomo 1 (1q23), através da hibridização *in situ* com o uso de fluorescência. Este gene consiste de aproximadamente 8 kb, possuindo 4 exons. Uma seqüência de aproximadamente 300 pb que antecede o códon de iniciação ATG mostrou estar altamente conservada nessas duas espécies. Vários elementos reguladores de expressão foram reconhecidos nessa região.

2.6.2 O Receptor Fas

O receptor Fas é uma proteína transmembrânica do tipo I, composta por 335 aminoácidos e peso molecular de 35 kDa, pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral. Ao interagir com seu ligante (FasL), desencadeia a apoptose (MÜLLAUER e cols., 2001). O sinal apoptótico é transmitido para o interior da célula via o “domínio da morte” localizado na porção intracelular do receptor à proteína adaptadora FADD, com um motivo homólogo à região citoplasmática do receptor Fas, que recruta pro-caspase 8. A agregação de caspases provoca a ativação destas por autoclivagem, que iniciam uma seqüência de ativações que culminam com a morte

celular. Uma via apoptótica alternativa, também mediada pelo receptor Fas, ocorre através da mitocôndria e depende, em parte, da proteína Bid (membro da família Bcl-2). Esta é clivada pela caspase 8 e se transloca para a membrana interna da mitocôndria, promovendo a liberação do citocromo C, que então desencadeia a cascata apoptótica descrita anteriormente (MÜLLAUER e cols., 2001).

Fas é expressa em uma ampla variedade de células e tecidos normais e malignos, incluindo linfócitos B e T ativados e linhagens linfóides malignas. Sua expressão não está restrita a células da linhagem hematopoiética, ocorrendo também em células epiteliais, osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais. Os padrões de expressão variam de acordo com o tipo celular ou tecidual. Timócitos humanos expressam Fas fracamente enquanto linfócitos T ativados possuem o receptor em abundância. Os níveis de expressão são regulados pelo INF- γ ou por uma combinação deste com TNF- α (NAGATA e GOLSTEIN, 1995).

2.6.3 O Ligante de Fas (FasL)

FasL é uma proteína de membrana do tipo II, constituída por 281 aminoácidos, pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). A identidade de sequência de aminoácidos entre humanos e murinos é de cerca de 76,9% (TAKAHASHI e cols., 1994).

A expressão do ligante de Fas foi observada primeiramente em células T ativadas, porém, sabe-se atualmente que vários outros tipos celulares produzem e secretam essa molécula. FasL é constitutivamente expresso em neutrófilos, neurônios, tireócitos, células do estroma da retina, células acinares das glândulas salivares e células de Sertoli nos testículos (French e cols., 1997 *apud* DE MARIA e cols., 1998). Porém, uma variedade de tipos celulares podem expressar FasL em resposta a diferentes condições estimuladoras, incluindo macrófagos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatócitos tratados com etanol, células leucêmicas sob ação de quimioterápicos além de células em transformação tumoral (French e cols., 1997; Badley e cols., 1997, *apud* DE MARIA e cols., 1998).

O ligante de Fas não é espécie-específico uma vez que a apoptose pode ser induzida em células humanas pelo FasL murino com mesma intensidade que o ligante humano agindo sobre células murinas (TAKAHASHI e cols., 1994).

2.6.4 Funções do Sistema Fas/FasL

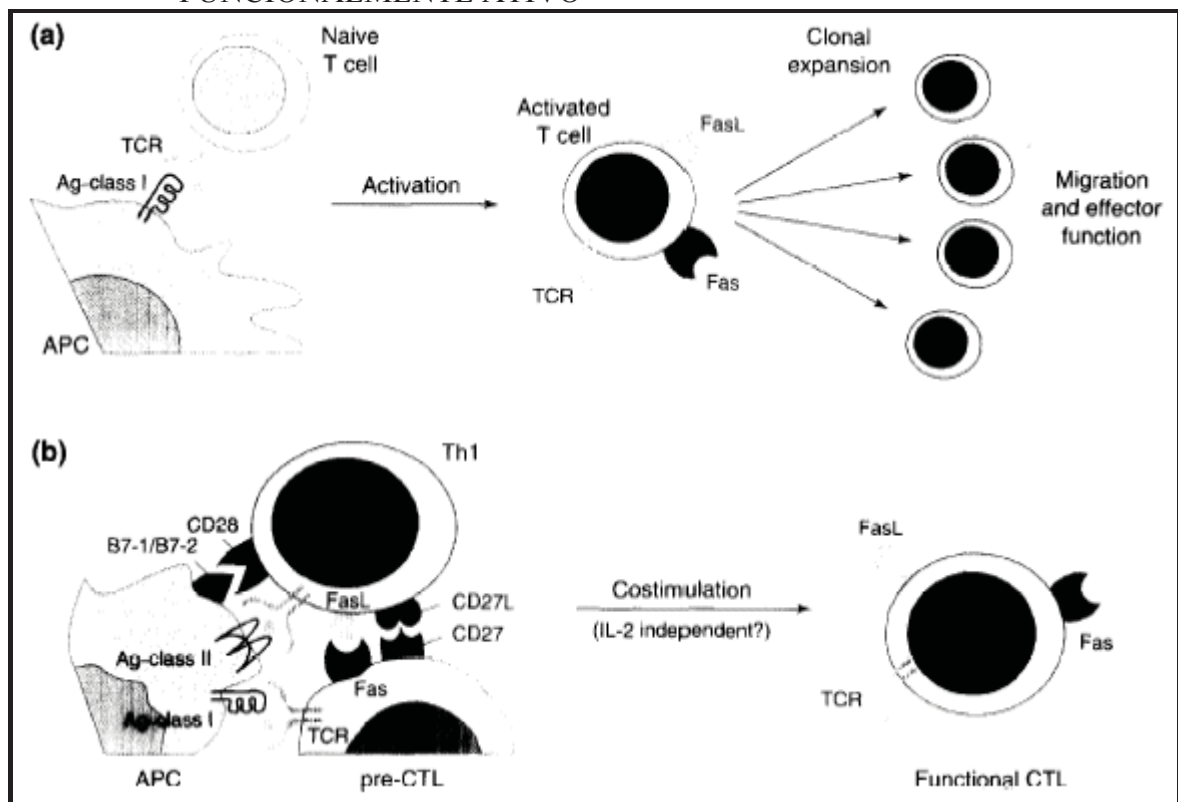
O receptor Fas foi originalmente descrito como uma molécula de superfície celular com capacidade de mediar a apoptose em células transformadas (TRAUTH e cols., 1989). Atualmente, sabe-se que clones de células T humanas normais ativadas também são susceptíveis à apoptose via Fas (OWEN-SCHAUB e cols., 1992).

A demonstração de que doenças linfoproliferativas em camundongos, *lpr/lpr* e *gld/gld*, são provenientes de defeitos nos genes FAS e FASL respectivamente, atenta para a importância do sistema Fas/FasL na regulação da resposta imune normal e manutenção da tolerância ao próprio. E mais, a estimulação deste sistema nem sempre induz um sinal apoptótico.

Em linfócitos T a função desempenhada pelo sistema depende do grau de ativação dessas células. Em estágios precoces da resposta imune, a sinalização via Fas promove a geração de uma resposta imune efetiva. Em linfócitos em repouso, a ativação celular via TCR em resposta a um antígeno apresentado a partir de célula apresentadora de antígeno (APC) leva a rápida secreção de Fas e FasL, promovendo expansão clonal, migração e resposta imune efetora. Já a interação de uma APC com uma célula Th1, leva à expressão de FasL nesta, ao mesmo tempo em que estimula um linfócito T pré-citotóxico (pré-CTL) via TCR. O ligante de Fas produzido pela célula T auxiliar age então sobre o receptor expresso na superfície do linfócito pré-CTL, resultando assim, por co-estimulação, em um linfócito T citotóxico funcional (LYNCH e cols., 1995) (Figura 5, a e b, respectivamente). A indução da morte celular via Fas ocorre em estágios mais avançados da resposta imune, promovendo uma regulação negativa das células T, através da diminuição do número de clones destas. Porém, nem todos os linfócitos T são eliminados, acreditando-se que, como o nível de estimulação antigênica decresce com a eliminação de células-alvo, diminui-se também a expressão

de FasL, reduzindo desta forma o processo de apoptose. Estas células “sobreviventes” talvez se tornem células de memória (LYNCH e cols., 1995).

FIGURA 5 - FUNÇÕES DE FAS E FASL NA CO-ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS T.
 (A) ESTIMULAÇÃO DO TCR POR PEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS APRESENTADOS PELAS MOLÉCULAS MHC, LEVANDO A EXPANSÃO CLONAL E FUNÇÃO EFETORA. (B) INTERAÇÃO ENTRE FASL, LINFÓCITO TH1 E FAS EM UM LINFÓCITO PRÉ-CTL PODE CONTRIBUIR PARA A DIFERENCIAÇÃO DESTE EM LINFÓCITO FUNCIONALMENTE ATIVO



LYNCH e cols., 1995

Apesar do sistema não estar envolvido no processo de seleção tímica, ele é um mecanismo de eliminação periférica de linfócitos autorreativos que escaparam desta. A eliminação de linfócitos B autorreativos na medula óssea também independe desse sistema, que entretanto pode agir na eliminação de células B ativadas na periferia (LYNCH e cols., 1995, DE MARIA e cols., 1998).

A destruição de células-alvo por linfócitos T citotóxicos se dá de duas maneiras. A primeira é a via que depende das perforinas (moléculas citotóxicas

primárias), e a segunda é através do sistema Fas, através da ativação policlonal vista anteriormente. O reconhecimento da célula-alvo pelo linfócito leva à expressão de FasL neste, que irá ligar-se ao receptor Fas da célula a ser lisada, o que desencadeia a apoptose.

Um outro aspecto do sistema Fas/FasL é a formação de sítios imunologicamente privilegiados, principalmente através da eliminação de células T ativadas. Sem a presença dessas células, por exemplo, a aceitação a enxertos é maior e a situação de risco de resposta imune da mãe contra o feto na gravidez são evitadas (HOLMES e cols., 1992; NAGATA e cols., 1995).

Ao contrário dos efeitos benéficos da expressão fisiológica de FasL, células tumorais expressando o ligante, podem eliminar os linfócitos T ativados que estejam expressando o receptor. Esse processo já foi visualizado em câncer de colo uterino (O'CONNELL e cols., 1996). O efeito imunossupressor realizado pelo ligante de Fas em células tumorais pode ser um possível mecanismo pelo qual o tumor escape da rejeição imunológica e continue crescendo.

Em situações patológicas, cuja base genética é a expressão anormal de Fas ou de FasL, pode ocorrer redução do limiar para ativação da apoptose, ocasionando um suicídio celular excessivo. Esta poderia não somente causar a deficiência funcional de órgãos (decréscimo da produção de saliva e lágrimas, hormônios da tireóide, insulina, etc.) mas também uma auto-sensibilização generalizada dentro dos órgãos-alvo, resultando em maior destruição tecidual por um segundo ataque imune envolvendo linfócitos, produção de citocinas, fatores citotóxicos e perforinas (TAX e cols., 1995).

Defeitos no funcionamento do sistema Fas/FasL causam doenças linfoproliferativas e aceleram doenças autoimunes. Camundongos portadores da mutação *lpr* no gene *FAS*, desenvolvem linfadenopatia (autossômica recessiva) com características que se assemelhavam ao lupus eritematoso sistêmico. Esta mutação levava à expressão não funcional do receptor, impedindo a transdução do sinal apoptótico (WATANABE-FUKUNAGA e cols., 1992).

Em estudo recente, PUVIANI e cols. (2003) mostraram a presença aumentada de FasL no soro de pacientes com pênfigo que não estão sob tratamento. Esta molécula

poderia estar agindo sobre queratinócitos expressando o receptor Fas, promovendo a apoptose dessas células através da ativação da caspase-8. Este evento pode estar contribuindo para a perda de adesão célula-célula na epiderme, levando assim, a formação de bolhas características desta patologia .

Os achados acima nos mostram que o complexo Fas/FasL, possui papéis benéficos e nocivos, em situações patológicas, nas funções do sistema imune. A variabilidade nos genes *FAS* e *FASL*, assim como os níveis de expressão de seus produtos gênicos e a maneira como as células estimuladas irão responder a esses sinais, contribuirão para uma resposta imune fisiológica ou patológica. Estudos de associação entre variantes desses genes e doenças, podem contribuir para o melhor entendimento de vários mecanismos celulares envolvidos nessas. Entre eles, a maneira pela qual células que estejam promovendo uma resposta imune alterada permanecem ativas, não sendo eliminadas pela morte celular programada.

2.6.5 Variabilidade Genética de *FAS*

Muitas doenças genéticas importantes e bem conhecidas resultam de uma mutação em um único gene, que compromete a função deste. Foram descritos até o momento 15738 distúrbios monogênicos, sendo 14741 em autossomos, 879 ligadas ao cromossomo X, 55 ligadas ao Y e 63 mitocondriais (OMIM, 2004).

A síndrome linfoproliferativa (ALPS) é uma doença autoimune, atribuída a mutações no gene *FAS*. Possui padrão de herança monogênico, com manifestação ainda na infância. Indivíduos afetados apresentam linfoproliferação exacerbada e expressividade variável de sintomas. Os linfócitos de pacientes com ALPS são menos sensíveis a indução da apoptose via receptor Fas. As mutações nesse gene encontram-se distribuídas pelos nove exons, porém foi observada uma maior concentração na sequência que codifica o domínio da morte (responsável pela transdução do sinal apoptótico). São, na sua maioria, sem sentido, e a gravidade do quadro clínico depende da localização da mutação. De um modo geral, aquelas que provocam alterações na porção intracelular do receptor possuem efeitos mais pronunciados do que aquelas que

codificam para a região extracelular (VAISHNAW e cols., 1999; MÜLLAUER e cols., 2001). A ALPS 0 é caracterizada por apresentar mutação no gene *FAS* em homozigose, com ausência do receptor, enquanto a ALPS 1 apresenta deficiência funcional parcial, uma vez que a mutação está em heterozigose com um alelo normal (RIEUX-LAUCAT e cols., 2003).

Porém, há variantes que podem ter um efeito pronunciado, diminuto ou nulo sobre o fenótipo, podendo ainda estarem associadas a doenças multifatoriais.

Devido ao importante papel desempenhado pelo sistema Fas/FasL, é possível inferir que algumas variantes localizadas nos seus genes possam estar modificando o nível de expressão do receptor e seu ligante, contribuindo para a exacerbação ou atenuação da apoptose, interferindo assim na resposta imune.

Uma alta incidência de mutações no gene *FAS* foi detectada em câncer de bexiga (12 de 43 pacientes analisados). Dentre as mutações identificadas, dez estavam localizadas na sequência que codifica para o domínio da morte, sendo que oito possuíam a mesma transição de G para A no nucleotídeo 993 (códon 251). Os autores sugerem que esta região seja um ponto quente para mutações em pacientes com câncer de bexiga (MÜLLAUER e cols., 2001).

HUANG e cols.(1997) identificaram duas posições polimórficas na região promotora do gene *FAS*, que possui aproximadamente 2000 pb. O primeiro polimorfismo está situado na posição -1377 e consiste na troca de G para A, que altera estruturalmente o sítio de ligação do fator de transcrição SP-1. Cerca de 20% da população caucasóide analisada era heterozigota. O outro polimorfismo está localizado na posição -670. A substituição de A para G elimina o sítio de ligação do fator de transcrição GAS. HUANG e cols. (1999) realizaram um estudo de associação entre o polimorfismo da posição -670 e artrite reumatóide (185 pacientes) e lupus eritematoso sistêmico (103 pacientes). Todos os pacientes eram caucasóides. Para artrite reumatóide, os resultados não foram conclusivos, uma vez que os resultados diferiram entre as duas sub-amostras analisadas. Esta discrepância foi atribuída à heterogeneidade das amostras, uma vez que os pacientes haviam sido classificados a partir de diferentes critérios de seleção. O alelo *FAS**-670A foi mais freqüente em

pacientes com lupus eritematoso sistêmico (SLE), porém, a diferença não atingiu significância estatística. Segundo os autores, novos estudos deverão se realizados para confirmar, ou não, as associações ou tendências por eles encontradas.

Uma nova variante polimórfica do gene *FAS* foi identificada no exon 2 (posição 297) através da técnica PCR-SSCP, em uma amostra de 57 pacientes com SLE. O alelo 297C mostrou estar em desequilíbrio de ligação com 416G (localizada no exon 3). O haplótipo formado por estes alelos mostrou-se significativamente associado à doença (12,2% em pacientes contra 3,0% em controles; OR=5,0). Porém, a transição do exon 3 é silenciosa, e cogita-se que a associação se deva a desequilíbrio de ligação com outra variante, que poderia estar regulando os níveis de transcrição ou processamento alternativo do RNAm (HORIUCHI e cols., 1999).

HUANG e MANOLIOS (2000) analisaram o polimorfismo da posição -1377 em uma amostra de 86 pacientes com lupus eritematoso sistêmico. As frequências foram: 13% para o alelo -1377A e 87% para o alelo -1377G. A frequência de pacientes homozigotos para -1377A foi de 2%. As frequências alélicas e genotípicas não diferiram entre pacientes e controles.

Vários estudos tem indicado uma função anormal do receptor Fas em pacientes com esclerose múltipla (MS) (DOWLING e cols., 1996). Uma vez que essa falha de função poderia ser resultado de uma alteração na regulação da expressão gênica de *FAS*, VEEN e cols. (2002), examinaram o polimorfismo da posição -670 em 382 pacientes com MS e 206 controles sadios, todos caucasóides. As frequências alélicas encontradas para o alelo *FAS**-670G foram 45% e 49%, e para o alelo *FAS**-670A 55% e 51%, em pacientes e controles, respectivamente. A frequência de indivíduos portadores do alelo *FAS**-670G foi significantemente menor em pacientes (69%) quando comparado aos controles (77%). Porém, nenhuma associação foi encontrada entre esse alelo e características clínicas da doença. A análise de imagens de ressonância magnética revelou padrões similares de lesões e volume de lesões cerebrais tanto em portadores e não portadores do respectivo alelo. Dessa forma, o alelo *FAS**-670G parece conferir resistência a EM, porém não interfere no curso da doença.

Variantes polimórficas do gene *FAS* foram pouco estudadas, apresentando na maioria dos casos, ausência de associação com doenças autoimunes. De toda forma, este gene continua sendo candidato para estudo de associação à doenças, uma vez que alterações na estrutura molecular, diferenças na expressão gênica e interação com outras moléculas podem estar influenciando na via apoptótica que leva a homeostase do organismo e manutenção da tolerância ao próprio. Estudos da interação entre linfócitos T e células-alvo, contribuiriam para o melhor entendimento da origem e evolução dos mecanismos de autoimunidade.

2.7 O GENE SUPRESSOR TUMORAL *TP53*

2.7.1 Histórico e Caracterização do Gene *TP53*

O gene *TP53* foi mapeado no cromossomo 17, através do uso de um clone de cDNA para análise de células híbridas murinas e humanas (McBRIDE e cols., 1985). Posteriormente o loco para *TP53* foi identificado na porção telomérica do braço curto desse cromossomo (17p13.1) (McBRIDE e cols., 1986).

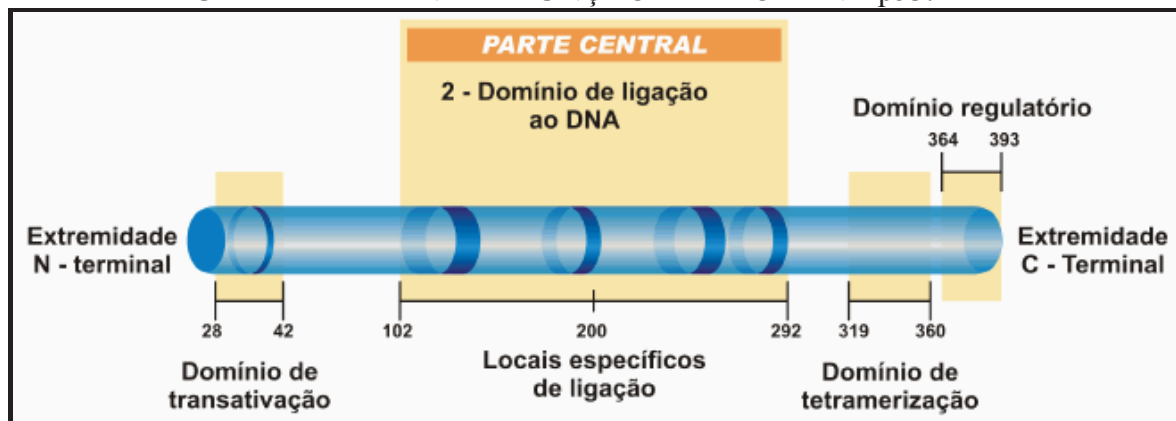
LAMB e cols. (1986) caracterizaram a estrutura do gene *TP53* humano através do seqüenciamento de clones de cosmídios e fagos lambda. O gene possui cerca de 20 kb e 11 exons, que variam de 22 a 1.268 pares de bases. O primeiro exon é não-codificante e está separado do segundo por um intron de 10 kb. A digestão da seqüência a 5' do exon 1 com enzimas de restrição seguida pela inserção dos fragmentos resultantes no gene da acetiltransferase e, posterior transfecção para células HeLa, identificou uma seqüência de 350 pb com atividade de promotor. O sítio Cap do RNAm também foi localizado dentro desse fragmento.

A identidade de seqüência de DNA entre as regiões codificantes humana e murina é de 81,2%, e essa conservação não está igualmente distribuída ao longo das duas moléculas. O gene *TP53* humano apresenta 6 kb a mais que o seu homólogo murino, pois alguns introns do gene humano são mais extensos em comparação aos introns murinos. A análise comparativa também mostrou que o primeiro códon ATG humano corresponde ao quarto códon murino (ZAKUT-HOURI e cols., 1985).

2.7.2 O Produto Gênico p53 e suas Funções

A proteína p53 é um monômero, com 53 kDa, constituída de 393 aminoácidos. Apresenta quatro domínios com funções distintas. Na extremidade amino-terminal localiza-se o domínio de transativação, responsável pela ativação específica de determinados genes. Na parte central existem quatro domínios de ligação ao DNA, através dos quais a proteína p53 é capaz de se ligar ao DNA em sítios específicos. Na extremidade carboxi-terminal encontram-se dois domínios. O primeiro é o domínio de tetramerização, responsável pela formação de tetrâmeros de p53, forma mais ativa da proteína. O segundo é o domínio regulador, que pode regular negativamente o domínio central, através de sua ligação a este, inibindo assim a ligação específica da proteína aos promotores dos genes que esta regula (STOREY e cols., 1998) (Figura 6). A proteína humana possui 77% de identidade com a proteína murina.

FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DOS 393 AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA p53 MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE REGIÕES DISTINTAS COM DIFERENTES FUNÇÕES. CADA DOMÍNIO É RESPONSÁVEL POR UMA DETERMINADA FUNÇÃO DA PROTEÍNA p53.



A presença de recomposição alternativa afetando a região carboxi-terminal já havia sido observada em murinos. FLAMAN e cols. (1996), mostraram esse processo no gene *TP53* de linfócitos humanos saudáveis, através da identificação de um RNA mensageiro com 133 pb adicionais provenientes do intron 9. Esta variante de RNAm codifica uma produto gênico de 341 aminoácidos, sendo 10 provenientes do novo “exon”. A proteína resultante é truncada, perdendo parte do seu domínio de

tetramerização, falhando ao ligar-se ao DNA *in vitro*, e mostrando déficit transcricional dos genes que esta proteína regula em células de mamíferos, *in vivo*.

Esta proteína com forma truncada é detectada em células normais em proliferação, mas geralmente está ausente ou em baixos níveis em células em repouso. Também encontra-se em uma grande variedade de células em transformação tumoral, nas quais seus níveis de expressão estão aumentados.

A p53 é uma fosfoproteína nuclear, implicada no controle do ciclo celular, reparo e síntese de DNA, diferenciação celular e programação de morte celular. Age como um fator de transcrição capaz de regular muitos genes (PRIVES e cols., 1999). Desempenha papel central nos pontos de checagem do ciclo celular, detectando células com dano no material genético, dirigindo-as para a apoptose caso não haja condições de reparo. Este processo envolve ainda as moléculas p21 e GADD45 (PRIVES e cols., 1999; MÜLLAUER e cols., 2001). Em situações de estresse celular como, por exemplo, hipoxia, na presença de oncogenes ativados ou ainda dano no DNA, os níveis intracelulares de p53 aumentam e esta proteína é ativada, induzindo a transcrição de genes-alvo, como por exemplo, o gene *BAX* (MÜLLAUER e cols., 2001). A molécula codificada por este se liga à molécula Bcl-2, antagonizando-a. Este processo promove a liberação do citocromo C através da formação de poros nas membranas mitocondriais (SCHENDEL e cols., 1998). Uma rota alternativa pela qual p53 pode sinalizar para a mitocôndria e induzir a apoptose é através do aumento dos níveis de radicais reativos de oxigênio (ROS). Nesta via, a p53 induz a expressão de genes que codificam proteínas catalisadoras das reações de oxi-redução, gerando conseqüentemente ROS. Este age na liberação do citocromo C da mitocôndria (POLYAK e cols., 1997).

Além dos mecanismos vistos acima, a expressão do gene *FAS* pode também ser ativada pela proteína p53 em resposta a danos no DNA. Além disso, a p53 parece facilitar o transporte do receptor Fas do complexo de Golgi para a membrana celular (BENNETT e cols., 1998).

Vários fatores contribuem para o destino da célula com dano no material genético a ser induzido pela p53. A célula pode ser mantida em repouso até que os

erros sejam reparados ou pode ser dirigida para a apoptose. Esta última ocorre em casos nos quais os danos são graves, os fatores de sobrevivência são limitantes, ou ainda caso determinados oncogenes estejam ativados (MÜLLAUER e cols., 2001).

2.7.3 Variabilidade Genética de *TP53*

As mutações somáticas no gene *TP53* são encontradas em cerca de 50 a 55% dos tumores humanos (MÜLLAUER e cols., 2001). Essas mutações ocorrem em mais de 50 tipos diferentes de tumores, incluindo os de bexiga, cérebro, mama, cólon, esôfago, laringe, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, próstata, pele, estômago e tireóide (JORDE e cols., 1999).

Embora as mutações no gene *TP53* sejam principalmente observadas em células somáticas, as mutações germinativas nesse gene são responsáveis pelo câncer herdado conhecido como síndrome de Li-Fraumeni (LFS). Esta síndrome, rara, possui padrão de herança autossômico dominante, sendo caracterizada por tumores de mama e cólon, tecidos moles, sarcoma, osteossarcoma, tumores cerebrais e leucemia (JORDE e cols., 1999). Como no retinoblastoma, ao se herdar um alelo *TP53* mutado, ocorre um aumento na probabilidade do indivíduo sofrer transformações celulares subsequentes, com conseqüente desenvolvimento de tumores.

HSU e cols. (1991) analisaram mutações do gene *TP53* em carcinomas hepatocelulares de pacientes provenientes da China, onde a hepatite B e a aflatoxina B1 são consideradas fatores de risco. Oito dos dezesseis tumores analisados apresentaram uma mutação de ponto (G→T) na terceira base do códon 249, que leva a substituição de arginina para serina. Esta transversão, encontrada em sete amostras de DNA, e a transversão guanina por citosina, presente em oito amostras, são condizentes com mutações causadas pelos fatores de risco. BRESSAC e cols. (1991) descreveram uma outra mutação, localizada no códon 157, onde a transversão guanina para timina leva a substituição do aminoácido valina por fenilalanina.

Em câncer de mama, CARRERE e cols. (1993) descreveram uma transversão citosina para adenina no códon 151, resultando na substituição de prolina por treonina.

Já CHEN e cols. (1991) haviam descrito uma transição citosina para timina nesta mesma posição, levando a troca de prolina para serina.

Como pode ser visto, mutações no gene *TP53* constituem uma das mais freqüentes alterações em câncer humano. BÉROUD e cols. (1996) organizaram um banco de dados, registrando cerca de 4.200 mutações descritas até o momento. Esse trabalho possibilita que novas abordagens sejam utilizadas para a melhor compreensão do desenvolvimento de casos de câncer, relacionando-os com efeitos do ambiente e de exposição a carcinógenos.

Além das mutações somáticas e germinativas descritas acima, polimorfismos do gene *TP53* vêm sendo identificados em várias populações humanas (Tabela I). As conseqüências funcionais dessas variações podem ser nulas ou ter efeito reduzido, porém, podem contribuir na determinação de caracteres poligênicos ou multifatoriais. Dentre os mecanismos pelos quais essa variabilidade poderia afetar a função da proteína p53 pode se sugerir o aumento ou diminuição dos eventos de *splicing* devido a alteração nos sítios desse, alteração da estabilidade do transcrito ou dos níveis de expressão gênica (IARC *TP53* Mutation Database, 2004).

A possível associação de determinadas variantes polimórficas do gene *TP53* com o aumento da susceptibilidade à transformação de células tumorais tem sido relatada em vários trabalhos. Estudos recentes demonstraram que o alelo que codifica para arginina (polimorfismo Arg72Pro), proveniente de uma substituição de citosina por guanina no nucleotídeo 12139 do exon 4, mostrou um produto gênico mais susceptível à degradação pela oncoproteína E6 do papilomavírus humano do que sua isoforma contendo prolina, em células de carcinoma cervical. Revelou-se uma alta freqüência de homozigotos *Arg72* entre os pacientes em comparação aos controles sadios, sugerindo um aumento de susceptibilidade de sete vezes para os portadores desse alelo em homozigose (STOREY e cols., 1998). KLAES e cols. (1999) utilizaram esta mesma abordagem na análise de 87 pacientes com câncer cervical e 151 controles normais, todos alemães. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas freqüências de homozigotos *Arg72* entre os dois grupos (52,8% e

55,7%). As frequências alélicas nos controles foram: 25,5% *Pro72* e 74,5% *Arg72* (KLAES e cols., 1999).

TABELA 1 - RELAÇÃO DOS PRINCIPAIS POLIMORFISMOS DO GENE TP53 (IARC TP53 Mutation Database, 2004).

EXON/ INTRON	CÓDON	NUCLEOTÍDEO	TIPO DA MUTACÃO	ALELO 1	ALELO 2	DESCRIÇÃO
Exon 2	21	11779	Ponto	GAC	GAT	Silenciosa
Exon 4	34	12026	Ponto	CCC	CCA	Silenciosa
Exon 4	36	12032	Ponto	CCG	CCA	Silenciosa
Exon 6	213	13399	Ponto	CGA	CGG	Silenciosa
Exon 4	47	12063	Ponto	CCG	TCG	Pro>Ser
Exon 4	72	12139	Ponto	CGC	CCC	Arg>Pro
Promotor	-	606	Deleção	-	-	-A
Intron 1	-	8545	Ponto	-	-	T>A
Intron 1	-	8703	Inserção	-	-	(AAAAT)n
Intron 2	-	11827	Ponto	-	-	G>C
Intron 3	-	11951	Inserção	-	-	+16 pb
Intron 6	-	13494	Ponto	-	-	G>A
Intron 6	-	13964	Ponto	-	-	G>C
Intron 7	-	14168	Ponto	-	-	G>T
Intron 7	-	14181	Ponto	-	-	C>T
Intron 7	-	14201	Ponto	-	-	T>G
Intron 7	-	14234	Ponto	-	-	T>C
Intron 7	-	14235	Ponto	-	-	T>C
Intron 9	-	14766	Ponto	-	-	T>C
Intron 10	-	17708	Ponto	-	-	A>T

O polimorfismo Arg72Pro ocorre em um domínio rico em prolina da proteína p53, o qual participa ativamente da indução da apoptose. DUMONT e cols. (2003) detectaram, através da análise de linhagens celulares, que o alelo *Arg72* induz a apoptose de forma marcadamente mais eficaz que o alelo *Pro72*. Este potencial apoptótico intensificado da variante *Arg72* é devido, em parte, a maior habilidade desta interagir com a mitocôndria, onde provoca a liberação do citocromo C para o citosol. Portanto, observa-se que as duas variantes do códon 72 são funcionalmente distintas, e estas diferenças podem influenciar no risco de desenvolvimento de câncer e seu tratamento, bem como contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes.

TAUBERT e cols. (2000) investigaram o polimorfismo de p53 para duas doenças autoimunes: artrite juvenil crônica (JCA) e artrite reumatóide (RA). Nenhuma

variação foi detectada nos códons 36, 47 e 213 entre os pacientes e controles, todos caucasoídes. Já a análise do polimorfismo do códon 72 mostrou um aumento da ocorrência de homozigotos *Pro72* entre os pacientes com JCA (18,8%) em relação aos controles (10,2%). A frequência dos alelos entre os controles foi: 68,0% *Arg72* e 32,0% *Pro72*. Já entre os pacientes, 65,6% e 34,4%, respectivamente. LEE e cols. (2001) investigaram a relação desse polimorfismo com a susceptibilidade a RA, através da análise de 114 pacientes e 114 controles, todos coreanos. As frequências para o alelo *Arg72* foi 58,8% tanto em pacientes como em controles. Conseqüentemente, nenhuma associação foi encontrada entre artrite reumatóide e o polimorfismo do códon 72.

Estudos recentes têm relatado a importância da apoptose via p53 e doença de Alzheimer (AD). ROSENMANN e cols. (2003) realizaram um estudo caso controle entre AD esporádica e o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* em 109 pacientes e 111 controles judeus. Nenhuma associação foi encontrada entre as variantes desse loco e AD.

2.8 A PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA BAX

2.8.1 Histórico e Caracterização do Gene *BAX*

Através da análise do DNA híbrido proveniente de células somáticas murinas e humanas e por hibridação *in situ*, APTE e cols. (1995) localizaram o gene *BAX* na posição 19q13.3-q13.4. MATSUDA e cols. (1996) localizaram o homólogo murino no cromossomo 7. Os genes humano e murino apresentam 89,5% de identidade. O gene *BAX* humano possui 6 exons e a região promotora contém quatro motivos homólogos ao sítios de ligação ao DNA da proteína p53. Ensaio envolvendo a região promotora de ambos os genes sugerem que *BAX* é ativado pela proteína p53, presumivelmente envolvido na via apoptótica regulada por esta proteína (TOSHIYUKI e cols., 1995).

2.8.2 O Produto Gênico Bax e suas Funções

Bax é uma proteína homóloga ao Bcl-2, com 21 kDa. Ela está localizada no citoplasma, estando às vezes ligada a membrana celular. APTE e cols. (1995) isolaram um clone de DNAc no qual o segmento de RNAm correspondente ao exon 3 encontrava-se ausente. Essa observação mostrou a existência de uma forma truncada da proteína, conhecida atualmente como Bax-delta. Ao contrário das outras formas descritas (alfa, beta e gama), esta proteína conserva a região de ancoragem à membrana, carboxi-terminal, bem como os domínios de homologia ao Bcl-2 (BH1 e BH2).

Bax é encontrada na forma de homodímeros ou heterodímeros, estes últimos na presença de Bcl-2 (MÜLLAUER e cols., 2001). Quando Bax está em maior quantidade, a morte celular é acelerada, através da antagonização da molécula antiapoptótica Bcl-2. OLTVAI e cols. (1993) mostraram um modelo no qual a razão Bcl-2/Bax determina a morte ou sobrevivência da célula, ocorrendo ou não, um estímulo apoptótico.

Estes estímulos apoptóticos ocorrem através da formação de poros na membrana externa da mitocôndria. A proteína Bax forma poros em membranas lipídicas promovendo a liberação do citocromo C (ADAMS e cols., 1998). Sabe-se que Bax liga-se ao complexo de poros de transição, canais responsáveis pelo controle de permeabilidade da mitocôndria, controlando sua ação (MARZO e cols., 1998). A transcrição do gene *BAX* é acionada pela proteína p53 e, em vários experimentos diferentes, Bax mediou cerca de 50% da morte celular desencadeada pela p53.

KNUDSON e cols. (1995) observaram que linhagens murinas *knockout* para o gene *BAX* eram viáveis, porém possuíam deficiências na indução da morte celular. Timócitos e células B mostraram hiperplasia e, em fêmeas, os ovários mostraram folículos em atresia com excesso de células granulosas. Os machos eram inférteis devido a problemas nos túbulos seminíferos causados por acúmulo de células germinativas pré-meióticas, que impossibilitavam a produção de espermatozóides. Já as células multinucleadas gigantes mostravam padrões de morte celular maciça. Esses

resultados indicam que deficiências na expressão do gene *BAX* resultam em hiper ou hipoplasia, dependendo do tipo celular analisado.

2.8.3 Variabilidade Genética de *BAX*

MEIJERINK e cols. (1998) encontraram uma mutação que ocasionava a substituição de glicina por arginina no códon 67 do gene *BAX*, em um paciente com leucemia linfoblástica aguda de célula T. Também foi encontrada uma deleção de 7 resíduos de guanina do conjunto G8 localizado entre os códons 38 a 41 do gene *BAX*.

KUHLMANN e cols. (2002) analisaram o polimorfismo que consiste em uma transição guanina para adenina na décima quarta base do intron 3 do gene *BAX*. Dos 105 pacientes alemães com esclerose múltipla (MS), 49 (8 homozigotos) apresentaram essa transição e entre os 99 controles sadios, 42 (4 homozigotos). As frequências alélicas foram similares nos dois grupos: 27% em pacientes e 23% em controles. Uma alteração no códon 167 (exon 6) foi encontrada em um paciente com MS, resultando na substituição de treonina por metionina.

Uma alteração no exon 5 do gene *BAX* foi observada por MIYAUCHI e cols. (1995) em um dos treze pacientes com linfoma não-Hodgkin de cabeça e pescoço. A deleção de um par de base no códon 129 provocava a formação de um códon de parada, por mudança no quadro de leitura.

Em leucemia linfocítica crônica de célula B (LLC) uma razão Bcl-2/Bax alta contribui para a não-indução da apoptose. SAXENA e cols. (2002) investigaram se alterações no gene *BAX* poderiam estar alterando sua expressão em pacientes com LLC. Através do seqüenciamento de amostras de DNA de 34 pacientes em diferentes estágios da doença e 25 controles, um novo polimorfismo na região 5' não traduzida foi descrito. Trata-se de uma transição guanina para adenina na posição -248, 146 nucleotídeos a montante da seqüência TATA box. As frequências alélicas para o alelo -248A foram 18% em pacientes e 3% em controles. Os resultados encontrados mostraram associação entre a redução da expressão da proteína ($P= 0,0049$), progressão do estágio 0 (segundo classificação de Rai), correspondente a linfocitose,

($P= 0,00018$) para os demais estágios (I à IV) e falha para desencadear uma resposta ativa ao tratamento com quimioterápicos ($P=0,038$).

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O pênfigo foliáceo é uma doença autoimune de etiologia multifatorial, complexa. Fatores genéticos e ambientais, juntamente com outras variáveis endógenas e exógenas, contribuem para a sua patogênese. Esta doença encontra-se sob a forma endêmica, no Brasil, sendo a sua distribuição geográfica correlacionada com a ocorrência de um inseto do gênero *Simulium*. Por se tratar de uma doença que afeta a epiderme, os pacientes tornam-se mais susceptíveis a infecções, devido à perda dessa barreira natural de defesa. A elucidação de fatores genéticos que possam estar associados a esta doença contribuirá para que sua etiopatogênese seja melhor compreendida, na busca de procedimentos que possam minimizar seus efeitos.

O presente trabalho tem como objetivo a investigação de possíveis associações entre polimorfismos de genes de apoptose (*FAS*, *BAX* e *TP53*) e pênfigo foliáceo, através de análise de associação caso-controle. Dessa forma, procura-se verificar se variantes desses genes participam do desenvolvimento dessa doença.

Os objetivos deste trabalho são:

- a) estimar as freqüências de indivíduos portadores dos alelos, as freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas para os genes *FAS*, *TP53* e *BAX*. Uma vez que estes genes foram estudados em poucas populações, este estudo contribuirá na descrição do polimorfismo desses genes na população brasileira;
- b) investigar se há associação entre os genes *FAS*, *TP53* e *BAX* e a doença, através da comparação das freqüências de indivíduos portadores dos alelos, das freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas, observadas em amostras populacionais, de pacientes e de indivíduos-controle;
- c) elucidar se há algum tipo de interação entre os genes estudados, e também analisar a interação desses com os genes *HLA-DRB1*, *IL4* e *IL6*, já analisados anteriormente por nosso grupo, nos quais foram encontradas associações positivas e/ou negativas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Foram analisados 596 indivíduos, sendo 238 pacientes e 358 indivíduos-controle. Porém esse número diferiu de acordo com o gene analisado. Em relação a origem étnica, a amostra de pacientes foi composta de 56,9% de euro-brasileiros (EU) e 43,1% afro-brasileiros (grupo que inclui mulatos claros [MC], médios [MM], escuros [ME] e negros [N]). A amostra de controles foi composta por 68,2% EU e 31,8% afro-brasileiros. O grupo de controles foi composto da maneira mais homogênea possível em comparação ao grupo de pacientes, levando-se em conta o pareamento por origem étnica, origem geográfica e ocupação (gráfico 1). A idade e a região do país na qual se manifestou a lesão primária nos pacientes estão mostrados nos gráficos 2 e 3, respectivamente. Em relação à proporção sexual entre os pacientes, 52,3% são mulheres e 47,7% homens. Entre os controles, 54,7% e 45,3%, respectivamente. As frequências relativas correspondentes a idade e região do país na qual houve a manifestação da lesão primária estão detalhadas nos gráficos 2 e 3.

As amostras de sangue utilizadas para a extração de DNA nesse estudo foram obtidas em anos e locais diferentes, totalizando sete coletas, no período de 1987 a janeiro de 2004.

A primeira coleta das amostras de pacientes foi feita no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara (Piraquara/PR) em 1987 (n=20). As outras três amostras de pacientes foram coletadas nos anos de 1997 e 1998 (n=121), no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande/MS). Em julho de 2001, julho de 2002 (n=71) e janeiro de 2004 (n=26), foram realizadas novas coletas de amostras tanto de pacientes como de indivíduos-controle, no Hospital Adventista do Pênfigo, em colaboração com o Dr. Alfredo Marquat Filho e sua equipe. O diagnóstico desses pacientes foi estabelecido mediante observações clínicas e exames imunopatológicos. As amostras dos indivíduos do grupo controle foram obtidas no Hospital de Clínicas e Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (n=113), desde 1987 até o momento. Entre 1997 e 2004, também foram feitas coletas no Hospital Adventista

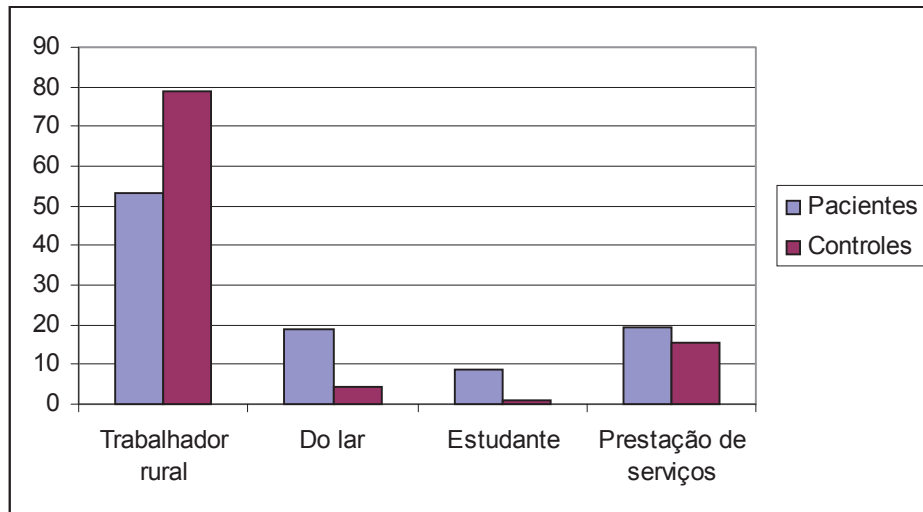
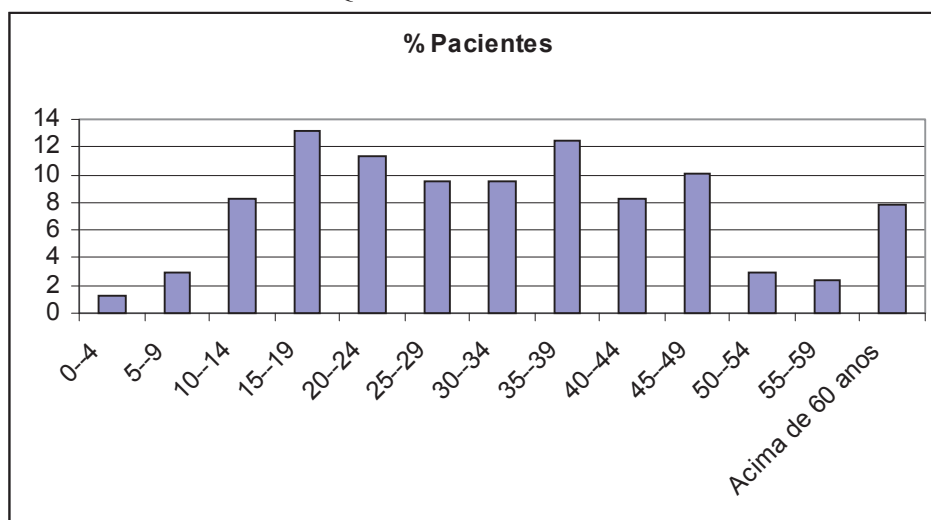
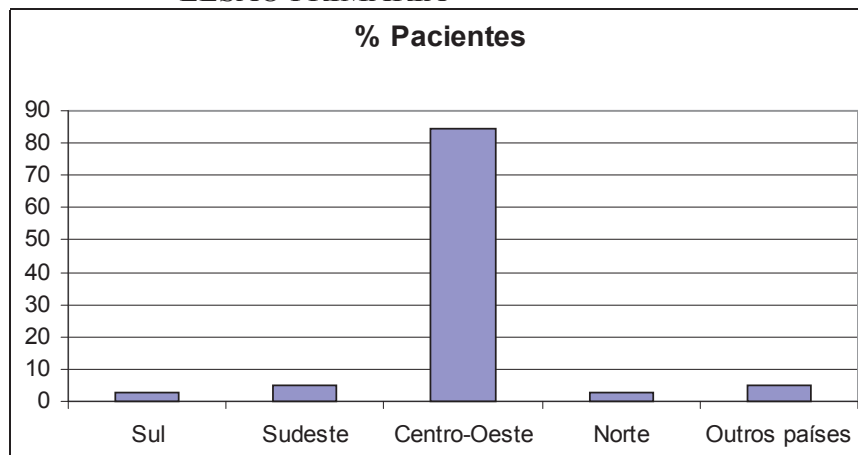
do Pênfigo (n=210), em Postos de Saúde de Campo Grande/MS, na Santa Casa de Misericórdia (n=35) (Curitiba/PR). Não foram incluídos nestes grupos indivíduos consanguíneos aos pacientes. Optou-se por parentes afins, vizinhos, amigos e cônjuges, além de muitos indivíduos não relacionados aos pacientes.

Antes de proceder à coleta do material, os indivíduos foram abordados para esclarecimento sobre os fins da pesquisa. Aceitando participar do estudo, o termo de anuência (anexo I) era lido e assinado pelos voluntários, que em seguida respondiam uma ficha de averiguação (anexo II). Foram coletados 15 mL de sangue periférico de cada indivíduo, os quais foram distribuídos em 2 tubos, um contendo EDTA dissódico e outro sem anticoagulante. Em seguida, procedeu-se a separação, por centrifugação, de alíquotas de soro, plasma e leucócitos, para utilização a curto ou longo prazo. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1 Extração de DNA

O DNA das primeiras amostras coletadas foi extraído anteriormente no Laboratório de Genética Molecular Humana. Para as amostras coletadas no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara, o DNA foi obtido pelo método de extração por fenol/clorofórmio (SAMBROOK e cols., 1989). O DNA das demais amostras coletadas no período de 1987 a 1998 foi obtido utilizando-se o método de *salting-out* (baseado em LAHIRI e NURNBERGER, 1991), e ajustando-se a concentração para 20µg/mL. O DNA das amostras das coletas dos anos de 2001, 2002 e 2004 foi extraído seguindo também o protocolo de SAMBROOK e cols. (1989).

GRÁFICO 1 - OCUPAÇÃO DE PACIENTES E CONTROLES (%)**GRÁFICO 2 - IDADE NA QUAL SE MANIFESTOU A LESÃO PRIMÁRIA****GRÁFICO 3 - REGIÃO DO PAÍS NA QUAL SE MANIFESTOU A LESÃO PRIMÁRIA**

4.2.2 Tipagem do Gene *FAS*

O segmento que inclui as variações de ponto G,A, localizadas nas posições – 1377 e -670 da região promotora do gene *FAS*, foi amplificado e tipado pela técnica de PCR-SSOP (Sequence Specific Oligonucleotides Probes). A PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da molécula de DNA, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e extensão das cadeias de DNA mediante a ação da enzima DNA polimerase. O método SSOP permite a discriminação alélica através do uso de sondas e análise do padrão de reação obtido.

As seqüências e posições dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas estão detalhadas na Figura 7. O tamanho do produto amplificado é 840 pares de base (pb) e o protocolo utilizado para a amplificação deste segmento gênico encontra-se descrito na Tabela 2. Para controle positivo de amplificação foi projetada uma sonda monomórfica, que contribuiu para a melhor discriminação entre sinais positivos e negativos no processo de hibridação. Foram tipados 42 pacientes e 152 controles para as posições -1377 e -670 do gene *FAS*.

FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DO FRAGMENTO AMPLIFICADO E POSIÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A TIPAGEM DO GENE *FAS*.

```

tcccttccttcctccctcacaccccttttccttccttcctttttacatttttttattttaaatgaacttttcatttttgga
atagtttttaggatttcaaaaaatttgcagagataatacagagaatgccatataccatcctccttatcccacttc
tttttgtgtctattagatgctcagagtgtgtgcacaaaggctggcacGcccagggctcttcctcatggcactaacag
tctactgaaaggtggaacagagacaagcctatcaacacctaagactggtggttaagtgcagtgcagatgcaaa
acacaggggtgatggaaagccctcaggagggtaacctaactagatttgaggggcccaaacaggctccagaagaaaa
tgtcaactgagaggaagcctgaaggatgaacagtgggctaagcaaagggttattaatgtgttattaatgggttga
atctaattgggaagggagagaggctgcagagtgcaggtgcagagccttggtggacgatgccaaaggaataactgaaac
ctttagtgtgtccagtctggaactgcacccaaattcagggttcagtaatgatgtcattatccaaacataccttctg
taaaattcatgctaaactacctaagagctatctaccgttccaaagcaatagtgactttgaacagtgttcaccaga
gcacgaaagaattacaagatttttttttaagaaaaattggccaggaaataatgagtaacgaaggacaggaagtaa
ttgtgaatgtttaatatagctggggctatgcgatttggcctaagttgttagctttgttttctcttgagaaataa
aaactaagggggccctcccttttcagagccctatggcgcaacatctgtactttttcatatggttaactgtccattc
cagGaacgtctgtgagcctctcatgttgagccacaacatggacagcccagtc aaatgccccgcaagtcttttctc
tgagtgcactccagcaattagccaaggctcctgtaccaggcaggacctctgcgctctgagctccattctccttca

```

Seqüência 5'-3' da região promotora do gene *FAS*, INCLUINDO as posições variáveis –1377 e –670

Azul: oligonucleotídeo iniciador FASPROMFW

Rosa: oligonucleotídeo iniciador FASPROMREV (seqüência complementar à apresentada na figura)

Amarelo: sondas FAS-1377G e FAS-1377A

Verde: sondas FAS-670G e FAS-670A

Vermelho: sonda monomórfica FASMOMSON

TABELA 2 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA O GENE *FAS*.

REAGENTES	QUANTIDADES
Quantidade de DNA	0,2 µg
Tampão Tth (Biotools) 10 X	1X
dNTP	0,2 Mm
MgCl ₂	1,5 mM
Oligonucleotídeos iniciadores	12 pmoles
Tth polimerase (Biotools)	0,8 U
Água ultra-pura q. s. p.	20,0 µL
Ciclagem: temperatura/tempo	
Início	
Desnaturação inicial	95°C - 3 min
Ciclos (n = 35)	
Desnaturação	95°C - 1 min
Anelamento	48°C - 1 min por 5 ciclos 45°C - 1 min por 5 ciclos 42°C - 1 min por 25 ciclos
Alongamento	72°C - 1 min
Final	
Alongamento final	72°C - 10 min
Término da reação	10°C - 10 min

4.2.3 Tipagem do Gene *BAX*

A análise genotípica da posição -248 (G,A) da região promotora do gene *BAX* foi realizada através do emprego da técnica de PCR-SSOP. Este polimorfismo foi descrito recentemente por Saxena e cols. (2002), através do sequenciamento de amostras de DNA de pacientes com leucemia linfocítica crônica e controles sadios. Para o presente estudo foram projetados oligonucleotídeos iniciadores e sondas, esquematizados na Figura 8. O tamanho do fragmento amplificado seguindo o protocolo descrito na Tabela 3 é 247 pb. Foram tipados 114 pacientes e 158 controles.

4.2.4 Hibridação de Oligonucleotídeos-Sonda para Discriminação Genotípica das Posições -1377 e -670 do Gene *FAS* e -248 do Gene *BAX*

Após amplificação das amostras para ambos os genes, foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose 1,5%, procurando verificar a intensidade do

produto amplificado. A voltagem utilizada foi de, aproximadamente, 100V/cm². Uma alíquota de 3µl do produto de PCR juntamente com 2µl de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol, 40% p/v de sucrose em água destilada) foi aplicada em gel. Após 40 minutos de corrida, o gel era corado em solução de brometo de etídeo (0,5µg/ml) por 20 minutos e as bandas visualizadas à luz ultravioleta.

FIGURA 8 - SEQUÊNCIA DO FRAGMENTO AMPLIFICADO E POSIÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A TIPAGEM DO GENE *BAX*.

aattcctttctgcgctggg**gagagctcaaaccctgcccg**aaacttctaaaaatggtgcctggataaatgaaggcat
tagagctgcgat**tggaacggGcggtgt**tggacggcgccactgctggcact**tatcgaggagatgctc**attggacagt
cacgtgacgggaccaaaccctcccagggagcgaggcaggtgcggtcacgtgacccggcggtgctgcggggcagcg
gccatttttgcggggcgcca**cgtgaaggacgcacgttcag**cggggctctcacgtg

Sequência 5'-3', INCLUINDO a região promotora do gene *BAX*

Em azul: oligonucleotídeo iniciador a montante BAX5'FOR

Em verde: oligonucleotídeo iniciador a jusante BAX5'REV (sequência complementar)

Em amarelo: posição das sondas para as variantes G (BAX-248G) e A (BAX-248A)

Em vermelho: sonda monomórfica

TABELA 3 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA O GENE *BAX*.

REAGENTES	QUANTIDADES
Quantidade de DNA	0,2 µg
Tampão Tth (Biotools) 10 X	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Oligonucleotídeos iniciadores	5 pmoles
Tth polimerase (Biotools)	0,7 U
Água ultra-pura q. s. p.	20,0 µl
Ciclagem: temperatura/tempo	
Início	
Desnaturação inicial	95°C - 3 min
Ciclos (n = 35)	
Desnaturação	95°C - 1 min
Anelamento	60°C – 1 min por 5 ciclos 57°C – 1 min por 5 ciclos 54°C – 1min por 25 ciclos
Alongamento	72°C - 1 min
Final	
Alongamento final	72°C - 10 min
Término da reação	10°C - 10 min

Membranas de nylon carregadas positivamente (Hybond N+ Amersham) foram quadriculadas manualmente, cada quadrado ($0,5\text{ cm}^2$) correspondendo à posição de uma amostra. Depois foram hidratadas com SSPE 3X e secadas à temperatura ambiente.

Uma alíquota de $2\text{ }\mu\text{l}$ de cada amostra amplificada para *BAX* e *FAS* foi aplicada nas respectivas posições das membranas para cada gene, separadamente. Após a secagem dos produtos nas membranas por 37°C durante 30 minutos, os produtos de PCR foram desnaturados (NaOH $0,4\text{N}$ por 5 minutos). Em seguida as membranas foram neutralizadas com SSPE 3X durante 10 minutos. Após a secagem, os produtos de PCR foram fixados por meio de calor (80°C por 2 horas).

Para iniciar o processo de hibridação, as membranas foram colocadas em frascos próprios para o forno de hibridação (Hybaib) e tratadas com 10 mL de SSPE 4X a 42°C por 10 minutos.

A pré-hibridação foi realizada utilizando 10 mL de solução de TMAC, por 30 minutos a 42°C . Após, a cada tubo foram adicionados 10pmol/mL de solução de sonda previamente marcada com biotina. O protocolo de marcação está detalhado na Tabela 4. Os frascos foram recolocados no forno e deixados durante 1 hora a 42°C .

Transcorrida a etapa de hibridação, a solução-sonda foi retirada (pode ser reutilizada), partindo-se para a etapa da lavagem de baixa estrigência, na qual 10 mL de solução A foram adicionados aos frascos, permanecendo por 10 minutos a 37°C . Este procedimento foi repetido mais uma vez.

Em seguida realizou-se a lavagem de alta estrigência. Foram adicionados ao frasco 10 mL de solução contendo TMAC, pré-aquecida na temperatura de lavagem. Utilizou-se lavagem de alta estrigência a 54°C para as sondas do gene *BAX* e 56°C para as do gene *FAS*, por 20 minutos após o forno de hibridação atingir a temperatura em questão.

Transcorrido o tempo, iniciou-se o processo de revelação, no qual 10 mL de SSPE 3X +SDS 0,5% foram acrescentados ao frasco, por 10 minutos a 37°C . Esse passo foi repetido, acrescentando-se então o conjugado HRP-SA (concentração final: $0,5\text{ }\mu\text{l/mL}$) por 30 minutos a 37°C .

Em seguida, foi realizada a lavagem com 10 mL de SSPE 1X +SDS 0,1%, por 10 minutos a 37°C. Esse passo foi repetido mais uma vez. Então as membranas foram acidificadas com 5 mL de tampão citrato, por 5 minutos a 37°C.

Para a reação colorimétrica foi preparada a seguinte solução: 5 mL de tampão citrato + 3µl de H₂O₂ (concentração 3%) +150 µl de TMB (2 mg/mL, diluído em água). Essa solução foi adicionada ao frasco, que ficava no forno por mais 10 minutos. Como essa reação se processa na ausência de luz, a frente do forno foi coberta.

Terminado o processo de hibridação, as membranas foram colocadas em um recipiente contendo H₂O e guardadas em geladeira, até que fosse realizada a leitura.

Para o registro dos resultados, os sinais foram classificados de acordo com os escores mostrados na Tabela 5. As dúvidas dos escores 4 e 6 podem ser resolvidas utilizando-se controles negativos e positivos para cada genótipo.

Realizada a leitura, as membranas foram fotocopiadas e, em seguida, descoloridas com etanol 80%, até a completa descoloração. A desibridação foi feita com NaOH 0,4N, a 70°C por 30 minutos. Em seguida a solução foi retirada, adicionado-se a solução de desibridação II, que permaneceu à mesma temperatura e tempo que a solução anterior. Terminado o processo, as membranas foram guardadas úmidas, seladas em plástico.

4.2.5 Tipagem do Gene *TP53*

A discriminação alélica para o gene *TP53* foi realizada através da técnica PCR-RFLP (PCR, seguida de análise por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). Oligonucleotídeos iniciadores específicos para o exon 4 foram utilizados para amplificar um fragmento de 182 pb contendo a posição variável Arg72Pro (Tabela 6). O produto amplificado de acordo com o protocolo descrito na Tabela 7 foi submetido à digestão com a enzima de restrição *BseDI* (Tabela 8). Os produtos digeridos juntamente com 3µl de corante azul de bromofenol foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 3%, por 1 hora e 30 minutos. A voltagem utilizada foi 100V/cm². Após a corrida, os géis foram corados em solução de brometo

de etídeo (0,5µg/ml) por 40 minutos e as bandas visualizadas à luz ultra-violeta. O padrão de discriminação genotípica observados nas eletroforeses está esquematizado na Figura 9. Foram tipados 143 pacientes e 290 controles.

TABELA 4 - PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE SONDAS PARA OS GENES *BAX* E *FAS*

REAGENTES	QUANTIDADES
Tampão 10 X	1X
Oligonucleotídeo (10 µM)	5 pmol
CoCl ₂ (2,5 mM)	0,25 mM
Oligonucleotídeos Iniciadores	5 pmoles
Biotina (1 mM)	50 mM
TdT (20U/ µl)	10 U
Água ultra-pura q.s. p.	50,0 µl
Temperatura/Tempo	37°C – 15 min

TABELA 5 - ESCORES UTILIZADOS PARA REGISTRO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR PCR-SSOP.

Código	Intensidade	Interpretação
0	Ilegível/não interpretável	Ausência de informação
1	Ausência de sinal	Negativo
2	Sinal muito fraco	Negativo
4	Sinal intermediário	Positivo ou negativo, conforme a qualidade da PCR e o poder discriminatório da sonda
6	Sinal nítido	Positivo, na maioria dos casos, podendo ser falso positivo se a temperatura de alta estringência estiver baixa ou o produto de PCR tiver ótima qualidade
8	Sinal forte	Positivo forte
9	Sinal extra-forte	Positivo extra forte

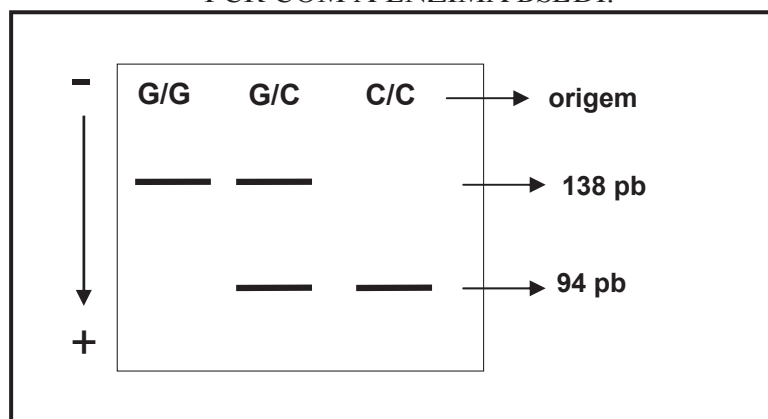
TABELA 6 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O EXON 4 DO GENE *TP53*.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência 5' - 3'
TP53FW4	AAGACCCAGGTCCAGATGAAG
TP53REV4	AGAATGCAAGAAGCCCAGAC

Klaes e cols. (1999)

TABELA 7 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA *TP53*.

REAGENTES	QUANTIDADES
Quantidade de DNA	0,2 µg
Tampão Tth (Biotools) 10 X	1X
dNTP	0,2 Mm
MgCl ₂	1,5 mM
Oligonucleotídeos iniciadores	8 pmoles
Tth polimerase (Biotools)	0,7 U
Água ultra-pura q. s. p.	20,0 µL
Ciclagem: temperatura/tempo	
Início	
Desnaturação inicial	94°C - 3 min
Ciclos (n = 35)	
Desnaturação	94°C - 1 min
Anelamento	58°C - 1 min
Alongamento	72°C - 1 min
Final	
Alongamento final	72°C - 6 min
Término da reação	10°C - 10 min

FIGURA 9 - GENE *TP53* - FRAGMENTOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR COM A ENZIMA *BSEDI*.**TABELA 8 - PROTOCOLO UTILIZADO NA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR DE *TP53*.**

REAGENTE	QUANTIDADE
Produto de PCR	5,0 µL
Tampão (Fermentas) 10 X	1X
Enzima de restrição <i>BseDI</i> (Fermentas)	0,75 U
Água Mili-Q q.s. p	10,0 µL
Temperatura/tempo	55°C - 2 h

4.2.6 Análise Estatística

Os genótipos provenientes das tipagens de todos os indivíduos foram repassados ao banco de dados no formato Access. Na próxima etapa, o programa CONVERT 1.1 (PROBST, 1998) utiliza estas informações para calcular as frequências genotípicas e criar arquivos de entrada de dados para a posterior utilização pelo pacote de programas ARLEQUIN v. 2.0 (SCHEIDER e cols., 2000). Com auxílio deste, foram obtidas por contagem direta, as frequências alélicas e haplotípicas para os genes *FAS*, *TP53* e *BAX*. As frequências genotípicas obtidas nas tipagens foram comparadas com as esperadas segundo o teorema de Hardy e Weinberg, através do método de GUO e THOMPSON (1992).

As diferenças de frequências de algum fator entre pacientes e controles foram testadas estatisticamente através do teste exato de Fisher, pelo algoritmo metropolis, utilizando o programa RXC (MILLER, 1997). Diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) indicam presença de associação. Também foi realizado o cálculo de OR (*odds ratio*) que dará a razão de chances, com um intervalo de confiança (IC) igual a 95%. O IC 95% juntamente com o valor de P obtido pelo teste exato de Fisher, fornecerá informação sobre a significância das diferenças entre pacientes e controles. Caso se julgasse necessário, a correção para múltiplos testes (correção de Bonferroni) poderia ser utilizada no ajuste do valor de P .

A OR é dada a partir da fórmula: $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOOLF, 1995), sendo os valores A, B, C e D obtidos através do esquema mostrado na Tabela 9. Quando necessário, a correção de Haldane foi utilizada. Esta correção é feita a partir da seguinte fórmula: $OR = (A + 0,5) \cdot (D + 0,5) / (B + 0,5) \cdot (C + 0,5)$.

O resultado dessa OR, para doenças raras, se aproxima do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a doença é mais frequente entre os portadores de um determinado fator, comparando indivíduos sem o fator (SVEJGAARD e cols., 1974). Valores de OR iguais a 1 significam ausência de associação do fator analisado com a doença em questão. Já valores acima de 1 indicam

uma maior probabilidade de desenvolver a doença, e valores menores que este revelam a existência de uma certa proteção contra o desenvolvimento da patologia.

TABELA 9 - DISPOSIÇÃO DOS DADOS PARA CÁLCULO DA OR

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	C
Negativo para o fator pesquisado	B	D

No caso de serem detectadas associações positivas com alelos de diferentes genes, é interessante verificar qual associação é mais importante e o tipo de interação existente. E mesmo quando a análise de vários genes, individualmente, não mostrar associações, a análise estratificada pode revelar interações gênicas: é possível que o efeito dos genótipos de um gene A dependa dos genótipos para um gene B, e/ou vice-versa. O método utilizado para este tipo de análise foi aquele sugerido por SVEJGAARD e cols. (1994). Este consiste da construção de uma tabela 2x4 (Tabela 10) , com as quatro combinações fenotípicas possíveis com dois fatores de cada vez, em pacientes e controles. Os dados serão analisados, a partir dessa primeira tabela, desmembrando-a em várias tabelas 2x2. Assim, pode-se analisar se um dos fatores é preponderante, se a participação de um deles é independente da do outro, se há interação entre ambos os fatores, se há efeito cumulativo ou se há desequilíbrio de ligação entre pacientes ou entre controles (Tabela 11).

TABELA 10 - DADOS PARA ANÁLISE ESTRATIFICADA SEGUNDO SVEJGAARD E RYDER (1994).

Fator A	Fator B	Pacientes (n)	Controles (n)
+	+	x1	y1
+	-	x2	y2
-	+	x3	y3
-	-	x4	y4

n: número absoluto de pacientes e controles

TABELA 11 - COMPARAÇÕES EFETUADAS NA ANÁLISE ESTRATIFICADA DOS FATORES A E B

	a	b	c	d	Teste n.º	Questão analisada
A vs não-A	x1+x2	x3+x4	y1+y2	y3+y4	[1]	O fator A está associado?
B vs não-B	x1+x3	x2+x4	y1+y3	y2+y4	[2]	O fator B está associado?
++ vs -+	x1	x3	y1	y3	[3]	A está associado em B positivos?
+ - vs - -	x2	x4	y2	y4	[4]	A está associado em B negativos?
++ vs +-	x1	x2	y1	y2	[5]	B está associado em A positivos?
-+ vs - -	x3	x4	y3	y4	[6]	B está associado em A negativos?
+ - vs - +	x2	x3	y2	y3	[7]	As associações entre A e B diferem?
++ vs - -	x1	x4	y1	y4	[8]	Há efeito combinado dos dois fatores?
Associação em pacientes	x1	x2	x3	x4	[9]	Há desequilíbrio de ligação em pacientes?
Associação em controles	y1	y2	y3	y4	[10]	Há desequilíbrio de ligação em controles?

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE *BAX* E PFE

Para o SNP do gene *BAX*, situado na região promotora, na posição -248 (G, A), foram tipados 114 pacientes, 149 controles específicos e 115 controles provenientes da região metropolitana de Curitiba. Todos os subgrupos de amostras encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Um teste de homogeneidade entre as amostras de controles específicos para PFE e controles da região metropolitana de Curitiba foi realizado, procurando verificar se estas diferiam em relação às suas frequências alélicas. Como a diferença foi estatisticamente significativa ($P=0,004840$), apenas os controles específicos foram considerados na análise. Pacientes e controles foram subdivididos em euro e afro-brasileiros, e as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas (Tabelas 12,13 e 14,) não evidenciam associação, positiva ou negativa, entre as variantes A e G da posição -248 do gene *BAX* e PFE.

A análise estratificada das variantes da posição -248 do gene *BAX* juntamente com os outros genes analisados nesse estudo e também com os genes *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1*, não revelou indícios de associação com PFE, a não ser as associações primárias com estes últimos, descritas anteriormente por nosso grupo (PAVONI e cols., 2003; PEREIRA e cols., 2004) (resultados não mostrados).

5.2. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE *FAS* E PFE

Para o gene *FAS*, foram analisados dois SNPs, -1377 (G, A) e -670 (G, A), localizados na região promotora. Ao total, 203 indivíduos (euro e afro-brasileiros) foram tipados, sendo 73 pacientes e 130 controles. Devido ao pequeno número de indivíduos afro-brasileiros na amostra (31 pacientes e 28 controles), em consequência da dificuldade de amplificação do DNA, as análises de associação foram realizadas somente para o grupo de euro-brasileiros.

TABELA 12 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA A POSIÇÃO -248 DO GENE *BAX*.

Alelo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
EU	(n=61)		(n=102)				
<i>G</i>	113	92,6	191	93,6	0,85	0,35 – 2,06	0,820020
<i>A</i>	9	7,4	13	6,4	0,66	0,31 – 1,38	
AF	(n=53)		(n=56)				
<i>G</i>	99	93,4	102	91,1	1,39	0,51 – 3,79	0,608540
<i>A</i>	7	6,6	10	8,9	0,72	0,26 – 1,97	

n: tamanho amostral

OR: odds ratio

P: probabilidade

IC: intervalo de confiança

EU: euro-brasileiros

AF: afro-brasileiros

TABELA 13 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A POSIÇÃO -248 DO GENE *BAX*.

Genótipo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
EU	(n=61)		(n=102)				
<i>G/G</i>	52	85,2	89	87,3	0,84	0,34 – 2,11	0,815140
<i>G/A</i>	9	14,8	13	12,7	1,18	0,47 – 2,96	0,357600
<i>A/A</i>	0	-	0	-	NA	NA	NA
AF	(n=53)		(n=56)				
<i>G/G</i>	47	88,7	46	82,1	1,70	0,57 – 5,07	0,425920
<i>G/A</i>	5	9,4	10	17,9	0,48	0,15 - 1,51	0,281300
<i>A/A</i>	1	1,9	0	0	3,23	0,13 – 81,02	0,486500

Ver legenda da tabela 12

NA: não analisado

TABELA 14 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO -248 DO GENE *BAX*.

Alelo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
EU	(n=61)		(n=102)				
<i>G</i>	61	100	102	100	NA	NA	NA
<i>A</i>	9	14,7	13	12,7	1,18	0,47-2,96	0,814960
AF	(n=53)		(n=56)				
<i>G</i>	52	98,1	56	100	0,31	0,01 – 7,77	0,484300
<i>A</i>	6	11,3	10	17,9	0,59	0,20 – 1,75	0,419760

Ver legenda da tabela 12

NA: não analisado

O teste de homogeneidade entre as amostras de controles específicos para PFE e controles da região metropolitana de Curitiba não revelou diferenças estatisticamente significantes de frequências alélicas, genótípicas e de indivíduos portadores de alelo nos dois grupos, permitindo portanto, aumentar o tamanho da amostra controle nas análises de associação.

Foram detectados desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo dos controles, tanto para a posição -1377 como para a posição -670 ($P=0,03970$ e $P=0,01523$, respectivamente)

Constata-se que não houve diferença estatisticamente significativa, quando frequências alélicas e de indivíduos portadores de alelo foram comparadas entre o grupo de pacientes e controles. Porém, em relação as frequências genótípicas, observa-se que o genótipo heterozigoto G/A para a posição -670 está presente em 57,5% dos pacientes e em 39,1% dos controles, uma diferença próxima ao limite de significância. Com base nos resultados podem ser vistos nas Tabelas 15, 16 e 17, sugere-se ausência de associação entre os dois SNPs estudados e PFE.

Ao se comparar às frequências haplotípicas para as posições -1377 e -670 entre pacientes e controles, conforme dados da Tabela 18, não se verificam diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles. O desequilíbrio de ligação entre as variantes das duas posições é absoluto, tanto em pacientes ($\Delta=0,0499$; $\Delta'=1$; $P=0,0064$) como em controles ($\Delta=0,0485$; $\Delta'=1$; $P=0,0000$), uma vez que o haplótipo A-A não foi encontrado nessa amostra populacional.

Não foram encontradas associações positivas ou negativas entre o gene *FAS* e os genes *BAX*, *TP53*, *IL6*, *IL4* e *HLA-DRB1* através de análise estratificada (resultados não mostrados), a não ser as associações já encontradas anteriormente para os três últimos genes.

5.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE *TP53* E PFE

Para as análises de associação, as amostras foram divididas em euro e afro-brasileiros. Todos os subgrupos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas, genótípicas e de indivíduos portadores dos diferentes alelos foram

comparadas dentro dos subgrupos de pacientes e controles, testando-se a significância dos desvios e estimando-se a razão de probabilidade (OR) (Tabelas 19, 20 e 21, respectivamente). Não foram encontradas associações entre as variantes do SNP 12139 do gene *TP53* e PFE.

Observa-se porém, que para o grupo afro-brasileiro, a diferença na frequência do alelo *TP53*12139G* entre pacientes e controles encontra-se próxima ao limite de significância.

Também para *TP53*, não foram encontradas associações com PFE, através da análise estratificada: os genótipos compostos, do SNP 12139 (G, C) distribuem-se de forma semelhante nas sub-amostras de pacientes e de controles, estratificadas para as variantes dos genes *BAX*, *FAS*, *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1* (resultados não mostrados).

TABELA 15 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA AS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE *FAS*.

Alelo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
-1377	(n=42)		(n=152)				
G	75	89,3	274	90,1	0,91	0,42 – 2,01	0,834440
A	9	10,7	30	9,9	1,10	0,50 - 2,41	
-670	(n=40)		(n=138)				
G	47	58,7	152	55,1	1,16	0,70 – 1,92	0,618680
A	33	41,3	124	44,9	0,86	0,52 – 1,43	

Ver legenda da tabela 12

TABELA 16 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA AS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE *FAS*.

Genótipo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
-1377	(n=42)		(n=152)				
G/G	33	78,6	126	82,9	0,76	0,32 – 1,77	0,340720
G/A	9	21,4	22	14,5	1,61	0,68 – 3,83	0,338640
A/A	0	-	4	2,6	0,39	0,02 - 7,36	0,579780
-670	(n=40)		(n=138)				
G/G	12	30,0	49	35,5	0,78	0,36-1,67	0,571920
G/A	23	57,5	54	39,1	2,10	1,03-4,30	0,048870
A/A	5	12,5	35	25,4	0,42	0,15-1,16	0,126940

Ver legenda da tabela 12

TABELA 17 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DAS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE *FAS*.

Alelo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
-1377	(n=42)		(n=152)				
G	42	100	148	97,4	2,58	0,14-48,80	0,580160
A	9	21,4	26	17,1	1,32	0,57-3,09	0,506300
-670	(n=40)		(n=138)				
G	35	87,5	103	74,6	2,38	0,86-6,55	0,125800
A	28	70,0	89	64,5	1,28	0,60-2,75	0,567320

Ver legenda da tabela 12

TABELA 18 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DAS POSIÇÕES -1377 E -670 DO GENE *FAS*.

Genótipo	Pacientes (n=38)	%	Controles (n=135)	%	OR	IC (95%)	P
A-G	9	11,8	29	10,7	1,12	0,50 – 2,47	0,838180
G-A	32	42,1	122	45,2	0,88	0,53 – 1,48	0,697880
G-G	35	46,1	119	44,1	1,08	0,65 – 1,81	0,800840

Ver legenda da tabela 12

TABELA 19 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA A POSIÇÃO 12139 DO GENE *TP53*.

Alelo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
EU	(n=86)		(n= 244)				
C	46	26,7	150	30,7	0,82	0,56 - 1,21	0,339400
G	126	73,3	338	69,3	1,22	0,82 – 1,79	
AF	(n=57)		(n=46)				
C	58	50,9	35	38,0	1,69	0,96-2,95	0,074360
G	56	49,1	57	62,0	0,59	0,34 – 1,04	

Ver legenda da tabela 12

TABELA 20 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A POSIÇÃO 12139 DO GENE *TP53*.

Genótipo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
EU	(n=86)		(n=244)				
C/C	5	5,8	23	9,4	0,59	0,22 – 1,61	0,815140
C/G	36	41,9	104	42,6	0,97	0,59 – 1,59	0,357600
G/G	45	52,3	117	47,9	1,19	0,73 – 1,95	0,527880
AF	(n=57)		(n=46)				
C/C	15	26,3	8	17,4	1,70	0,65 - 4,45	0,352900
C/G	28	49,1	19	41,3	1,37	0,63 - 3,00	0,554000
G/G	14	24,6	19	41,3	0,46	0,20 - 1,07	0,086760

Ver legenda da tabela 12

TABELA 21 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO AS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO 12139 DO GENE *TP53*.

Alelo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	P
EU	(n=86)		(n=244)				
C	41	47,7	127	52,0	0,84	0,51 – 1,37	0,541080
G	81	94,2	221	90,6	1,69	0,62 – 4,58	0,370920
AF	(n=57)		(n=46)				
C	43	75,4	27	58,7	2,16	0,93 - 5,01	0,099460
G	42	73,7	38	82,6	0,59	0,22 - 1,55	0,344700

Ver legenda da tabela 12

5.4 POLIMORFISMO DOS GENES *FAS*, *BAX* E *TP53* NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Através da análise do grupo de controles foi possível caracterizar o polimorfismo dos genes *BAX*, *FAS* e *TP53* em euro e afro-brasileiros. As frequências alélicas estão mostradas nas Tabelas 13,15 e 19, respectivamente. Já as frequências genotípicas encontram-se nas Tabelas 14, 16 e 20, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

A identificação de genes envolvidos em doenças complexas vem sendo intensificada atualmente, através da exploração das variações polimórficas do genoma humano (KIBERSTIS e ROBERTS, 2002). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) juntamente com os microssatélites, vem sendo amplamente utilizados como marcadores, principalmente por serem considerados uma ferramenta importante de mapeamento por desequilíbrio de ligação. Por outro lado, se estiverem localizados em genes candidatos e se resultarem em variação funcional, esses polimorfismos podem contribuir diretamente na susceptibilidade a doenças. Espera-se que a análise integrada de variáveis genéticas associadas a doenças, juntamente com fatores ambientais, possa levar à caracterização dos papéis de cada gene no desenvolvimento de doenças multifatoriais (WILLETT, 2002).

No genoma humano, seqüências codificadoras de proteínas contém aproximadamente de 100 a 300 mil SNPs, os quais juntamente com os muitos polimorfismos de DNA localizados em regiões reguladoras da expressão gênica, são informativos na busca de marcadores associados a doenças (CARGIL e cols., 1999). SNPs podem promover polimorfismo de aminoácidos na proteína (substituições não-silenciosas) ou afetar a expressão, especificidade tecidual ou função dessas (REBBECK e cols., 2004). Os SNPs funcionalmente relevantes são raros se comparados ao número total desses no genoma humano. Sua escassez pode ser consequência de seleção natural contra divergências funcionais provenientes da variação de aminoácidos (REBBECK e cols., 2004).

Um dos grandes desafios nos estudos de associação com doenças é escolher genes candidatos e, dentro desses, SNPs que, de alguma forma, possam estar contribuindo para sua patogênese. O conhecimento da função dos genes e da variação funcional decorrente da variabilidade do DNA, facilitam muito para uma escolha apropriada dos marcadores e na interpretação dos resultados nos estudos de associação com genes candidatos. A avaliação do significado funcional de variantes genéticas pode ser realizada através de diferentes abordagens. Essas incluem a análise das

alterações funcionais e/ou estruturais que estas variantes podem causar, das taxas de conservação evolutiva, de frequências em populações, além de outras abordagens experimentais e epidemiológicas. Também a consistência e reprodutibilidade das associações encontradas em diferentes estudos pode ser importante para a avaliação do significado funcional da variabilidade genética (REBBECK e cols., 2004).

Deficiências no mecanismo de apoptose podem contribuir para o início de uma doença autoimune, através da falha na eliminação de linfócitos autorreativos, ou até mesmo na fase efetora da doença, através de danos a tecidos-alvo. A síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), de padrão de herança monogênico, desenvolve-se a partir de uma deficiência na eliminação de linfócitos (VAUX e cols., 2000). Atualmente sabe-se que essa se origina a partir de mutações no gene *FAS* e, em alguns casos, do gene da caspase 10, impedindo a transdução de sinais pela via apoptótica que culminaria com a morte celular e manutenção de tolerância ao próprio.

Entretanto, somente uma pequena proporção das doenças autoimunes é proveniente de mutações em genes individuais. O conhecimento da patofisiologia de doenças autoimunes comuns requer a elucidação de vários sistemas diferentes que interagem em vias complexas, entre os quais está incluído o processo de apoptose.

O mapeamento de genes em humanos e camundongos afetados por doenças autoimunes tem evidenciado susceptibilidade a doenças e ligações com diversos segmentos genômicos. A identificação de genes de susceptibilidade para o diabetes, esclerose múltipla e outras doenças autoimunes tem sido alvo de muitos estudos. Os produtos de alguns dos genes localizados nos segmentos cromossômicos ligados à susceptibilidade a essas doenças possuem funções no processo de morte celular programada. Além disso, a habilidade de mutações genéticas em diversos genes provocarem doenças autoimunes, assim como a freqüente observação de autoimunidade patológica em vários modelos animais transgênicos, sugere que variantes genéticas de susceptibilidade a doenças autoimunes existam em todos os indivíduos. Alteração de qualquer um de muitos sistemas diferentes pode contribuir para uma maior probabilidade de desenvolvimento dessas doenças. Entretanto, dentro

do modelo multifatorial, o limiar entre o normal e o patológico é determinado por muitos genes que interagem através de vias complexas (VAUX e cols., 2000).

Recentemente, WANG e cols. (2004) sugeriram, após constatação de apoptose em queratinócitos nas áreas lesionadas, que essa poderia ser a causa do fenômeno acantolítico em pacientes com pênfigo vulgar. Os níveis de várias moléculas envolvidas na morte celular encontravam-se aumentados (Bax, p53, caspase-8, Fas, FasL). Essas observações geram novas perspectivas a respeito dos mecanismos envolvidos na indução do dano tecidual em doenças autoimunes e, em particular, em pênfigo.

No presente trabalho foram analisados SNPs dos genes *FAS*, *TP53* e *BAX*, todos responsáveis pela síntese de moléculas envolvidas no processo apoptótico. A escolha dos genes candidatos baseou-se no conhecimento de seu polimorfismo e da função dos seus produtos. Uma vez que alterações na via de morte celular podem ser responsáveis por doenças autoimunes, foi optado pela análise de SNPs que resultassem em alguma diferença funcional entre as variantes, ou seja, as quais pudessem estar ocasionando diferença de expressão gênica ou que promovessem troca de aminoácido. Essas diferenças poderiam estar envolvidas na falha de eliminação dos linfócitos auto-reativos em PFE, ou, alternativamente poderiam contribuir ao processo apoptótico no tecido-alvo.

Ainda que as possíveis diferenças funcionais pudessem resultar em variabilidade de susceptibilidade/resistência ao PFE, não foram encontradas associações, positivas ou negativas, entre as variantes estudadas e PFE, resultado que leva a propor que essas diferenças não são suficientes para desviar a remissão/recaída da doença estabelecido por outros fatores genéticos e ambientais.

A proteína p53 age como um fator de transcrição capaz de regular muitos genes. Suas principais funções são o controle do ciclo celular, reparo e síntese de DNA, diferenciação celular e indução de morte celular. É interessante notar que DUMONT e cols. (2003), ao investigarem o potencial apoptótico dos produtos gênicos das duas variantes polimórficas da posição 12139 (códon 72) do gene *TP53*, observaram que a molécula que possui arginina nessa posição induz a apoptose de

forma marcadamente mais eficaz do que aquela que possui uma prolina. Esta diferença pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes.

Esse polimorfismo vem sendo investigado intensivamente em vários tipos de câncer, procurando-se verificar se alguma dessas variantes estaria contribuindo para o aumento da susceptibilidade à transformação de células tumorais (STOREY e cols., 1998; KLAES e cols., 1999). A proteína p53 contendo arginina na posição do códon 72 mostrou-se mais susceptível à degradação pela oncoproteína E6 do papilomavírus humano do que sua isoforma contendo prolina, em células de carcinoma cervical. Uma alta frequência de homozigotos *Arg72* foi encontrada entre os pacientes, compatível com um aumento de susceptibilidade em sete vezes para os portadores desse alelo em homozigose (STOREY e cols., 1998). KLAES e cols. (1999) utilizaram esta mesma abordagem na análise de 87 pacientes com câncer cervical e 151 controles normais, da população alemã. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas frequências de homozigotos *Arg72* entre os dois grupos (52,8% e 55,7%). As frequências alélicas nos controles foram: 25,5% *Pro72* e 74,5% *Arg72* (KLAES e cols., 1999).

Com respeito à análise desse polimorfismo em doenças autoimunes, já foram realizados estudos para a artrite juvenil crônica (JCA), artrite reumatóide (RA) e doença de Alzheimer (AD). Um aumento da ocorrência de homozigotos *Pro72* foi encontrado entre os pacientes com JCA (TAUBERT e cols., 2000). Já na RA e AD nenhuma associação foi encontrada (LEE e cols., 2001; ROSENMAN e cols., 2003). Esse polimorfismo ainda não havia sido analisado em PFE. Entretanto, os resultados do presente estudo, assim como da maioria dos demais estudos sobre doenças autoimunes publicados, levam-nos a concluir que o polimorfismo *Pro72Arg* de p53 é pouco importante na patogênese do PFE e, possivelmente, de outras doenças autoimunes.

Através da análise do grupo controle, pode-se descrever a frequência dos alelos desta posição na população brasileira. Percebe-se que o alelo *TP53*12139G* apresenta maior frequência em relação a *TP53*12139C*, tanto em euro como em afro-brasileiros. Em afro-brasileiros: 38,0% e 62,0%; em euro-brasileiros: 30,7% e 69,3%,

para *TP53*12139C* e *TP53*12139G*, respectivamente. As frequências na população alemã foram: 25,5% e 74,5%, respectivamente (KLAES e cols., 1999). Percebe-se assim, um gradiente de frequências entre europeus, euro e afro-brasileiros. BRAUN-PRADO e cols. (2000) estimaram o grau de contribuição genética de europeus, africanos sub-saarianos e ameríndios na composição genética da população euro e afro-brasileira da região metropolitana de Curitiba. Para a sub-população branca, foram encontrados 94%, 35% e 3%. Para a sub-população de mulatos, 57%, 39% e 4%. Já para a sub-população negra, 25%, 74% e 1%. As frequências alélicas encontradas para euro-brasileiros no presente estudo e sua comparação com as frequências obtidas na população européia alemã, está de acordo com o grau de mistura já constatado por outros estudos de nosso grupo (BRAUN-PRADO e cols., 2000).

No gene *BAX*, foi analisado um polimorfismo localizado na região 5' não traduzida. Trata-se de uma transição de guanina para adenina na posição -248, descrito por SAXENA e cols. (2002). Por se tratar de um SNP descoberto recentemente, poucos estudos foram realizados até o momento. O alelo *BAX*-248A* foi encontrado associado positivamente a doença leucemia linfocítica crônica. A proteína codificada por este alelo apresenta baixos níveis de expressão, diminuindo dessa forma os níveis de apoptose, o que poderia levar à progressão da doença. Além disso, os autores sugeriram que esse alelo estaria relacionado a falha de uma resposta eficaz ao tratamento com quimioterápicos. Somente 3% dos controles (caucasóides) possuem esse alelo em relação a 18% dos pacientes (SAXENA e cols., 2002; MOSHYNSKA e cols., 2003). Nosso estudo foi pioneiro na análise desse polimorfismo em PFE. Foi constatada ausência de associação, o que nos leva a concluir que esse polimorfismo contribui pouco ou nada para a patogênese do PFE.

A análise da nossa amostra populacional permitiu a caracterização do padrão de distribuição alélica entre euro e afro-brasileiros. O alelo *BAX-248A* foi encontrado com frequência de 6,4% em euro-brasileiros e 8,9% em afro-brasileiros. Faltam informações na literatura sobre a frequência dessas variantes em outras populações.

O receptor Fas e seu ligante (FasL) vem sendo objeto de intenso estudo em doenças autoimunes, principalmente porque participam de vias que culminam com a morte celular programada, tendo além disso, importante papel na ativação e regulação de respostas imunes e na citotoxicidade mediada por células (LYNCH e cols., 1995). Variantes na região promotora do gene *FAS* podem influenciar os níveis de expressão do receptor, podendo ter efeitos sobre a indução da apoptose.

As variantes do SNP -1377 do gene *FAS* foram analisadas por HUANG e MANOLIOS (2000) na susceptibilidade ao lupus eritematoso sistêmico (LES) em caucasóides. Não foram encontradas associações com a doença, e a frequência dos alelos no grupo de pacientes foram 87% G e 13% A. Apenas 2% desses eram homozigotos para a variante menos freqüente. Como a apoptose possui um papel crucial na senescência, PINTI e cols. (2002) estudaram esse polimorfismo em 50 centenários caucasóides e 86 controles. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, e a frequência do alelo A foi de 17% na amostra controle.

O SNP -670 do gene *FAS* foi analisado em pacientes caucasóides com esclerose múltipla (MS). Os resultados indicam um efeito protetor do alelo G (OR= 0,59) (van VEEN e cols. 2002). HUANG e cols. (1999) verificaram associação positiva com o alelo A e homozigose A/A significativamente aumentada em pacientes com determinados sinais ou manifestações de LES (fotosensibilidade, $P= 0,03$; úlceras orais, $P=0,01$). NOLSOE e cols. (2000), em um estudo envolvendo 1068 dinamarqueses, entre afetados pela diabetes mellitus do tipo I e controles, não encontraram associação entre variantes desse SNP do gene *FAS* e a doença.

Neste trabalho, foram estudadas os SNPs -1377 (G, A) e -670 (G, A) localizados na região promotora do gene *FAS*. A primeira (G→A), altera estruturalmente o sítio de ligação do fator de transcrição SP-1, diminuindo a eficácia de ligação desse. Já na segunda a presença de guanina elimina o sítio de ligação do fator de transcrição GUS (HUANG e cols., 1999). Variantes de nenhuma das duas posições mostraram-se associadas com PFE. Um leve aumento do genótipo -670 G/A foi verificado nos pacientes (57,5 %) em relação aos controles (39,1%), encontrando-

se próximo ao limiar de significância ($P=0,048870$, $OR=2,10$). O grupo de controles para ambas as posições, não encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para a posição -1377, o valor de P encontra-se próximo ao limite de significância ($P=0,0397$). Para a posição -670 o valor de P foi 0,01523. Uma análise mais detalhada dos desvios, revelou que o genótipo A/A para a posição -1377 foi observado mais freqüentemente que o esperado, enquanto para a posição -670 o número de indivíduos heterozigotos é inferior com relação ao esperado. Este fato contribui para explicar porque os heterozigotos são mais freqüentes em pacientes, cuja amostra encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Ao analisar as possíveis causas do desvio do equilíbrio, não se pode deixar de refletir sobre possíveis falhas na técnica utilizada para genotipagem. Uma série de cuidados foram tomados para impedir erros de tipagem. As amostras de pacientes e controles foram genotipadas, para todos os genes, juntamente com dez controles “cegos”, além de tipagem em duplicata de cerca de 20 indivíduos. Os resultados foram concordantes, sem nenhuma exceção. Isso permite concluir que os resultados de tipagem são confiáveis e que o desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg observado não se deve a erros de tipagem. A ausência de equilíbrio poderia ainda ser proveniente de efeitos de amostragem, bem como ser consequência de uma amostra estruturada. Também essas fontes de desvio são pouco prováveis, quando se considera que vários outros genes já foram analisados para esta amostra sem que houvesse desvios do equilíbrio. Contudo, a não ocorrência de um acentuado erro de amostragem para uma série de genes não permite concluir que esse erro não pudesse levar a desvios significativos das freqüências genotípicas para algum outro gene. Estruturação da amostra provavelmente levaria a desvios de Hardy-Weinberg para mais de um gene (para todos os genes cuja freqüência alélicas diferisse significativamente entre populações ancestrais, por exemplo, européia e africana). Porém, erro de amostragem ocorre em amostras. Pode ser não significativo para um certo gene e significativo para outro, na mesma amostra. Essa é a causa mais provável do desvio observado (o qual aliás, está próximo ao limiar de significância. P seria maior que 0,05 após a correção de Bonferroni). Outra possibilidade é que estivesse ocorrendo seleção contra o

heterozigoto. REBBECK e cols. (2004) discutem várias abordagens para avaliação de possíveis efeitos funcionais de diferentes variantes genéticas analisadas em estudos associação com genes candidatos. Uma dessas abordagens é a partir da genética de populações. Desvios de frequências alélicas e genotípicas esperadas em grupos fenotípicos característicos (por exemplo, pacientes e controles) poderiam contribuir na identificação de alelos associados com a etiologia da doença. Portanto, desvios das proporções esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg poderiam revelar quais variantes poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento da doença. Na tentativa de compreender as possíveis causas dos desvios encontrados, novas tipagens deverão ser realizadas com outra técnica, buscando aumentar o tamanho amostral, uma vez que esse foi pequeno para o gene *FAS*, devido à qualidade de amplificação. O aumento do tamanho amostral pode diminuir assim o efeito de amostragem, podendo levar o grupo controle ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Porém, se o desvio persistir, as atenções deverão ser direcionadas para a elucidação da importância funcional deste SNP na etiologia do PFE.

Foram realizadas análises de interação entre os genes estudados no presente trabalho, e também análises de interação desses com genes cujas associações com PFE foram previamente descritas por nosso grupo (PAVONI e cols., 2003; PEREIRA e cols., 2004). As análises de interação seguindo os critérios 3,4,5,6 e 8 detalhados na Tabela 11 não revelaram interação entre as variantes dos genes *FAS*, *BAX* e *TP53*.

As análises de cada um desses genes (*FAS*, *BAX* e *TP53*) e variantes das posições -590 do gene *IL4* e -174 de *IL6* confirmaram a ausência de associações verificadas para os genes *FAS*, *BAX* e *TP53* individualmente. Todos os desvios significativos resultaram das associações previamente descritas por PEREIRA e cols. (2004). Nesse estudo foi encontrada uma associação positiva com o genótipo T/T de *IL4* -590 (OR=2,71; $P= 0,00461$) e uma associação negativa com a variante C (OR=0,37; $P= 0,00446$). Associações com variantes *IL6* -174 sugerem que o genótipo C/C possui um efeito protetor (OR=0,13; $P= 0,00202$) enquanto os indivíduos portadores do alelo G possuem maior susceptibilidade ao PFE (OR=7,66; $P= 0,00190$).

Para as análises de interação entre os genes *FAS*, *BAX* e *TP53* e *HLA-DRB1*, os alelos deste último foram agrupados segundo o critério 3 descrito por PAVONI e cols. (2003). Este critério divide os alelos do gene *HLA-DRB1* em três grupos de acordo com a OR obtida: susceptibilidade (SU), protetor (PR) e neutro (NE), considerando o limite de significância $P=0,01$. Dessa forma, os alelos de susceptibilidade são todos aqueles pertencentes aos grupos *HLA-DRB1*01* e **04*, os alelos protetores são aqueles pertencentes aos grupos *HLA-DRB1*07* e **08* e **11* e também *HLA-DRB1*0301*. Os demais alelos foram classificados como neutros. As análises entre o grupo de alelos SU com ambas as variantes para cada gene (*FAS*, *BAX* e *TP53*), não apresentaram desvios estatisticamente significantes, confirmando assim que os genes *FAS*, *BAX* e *TP53* não contribuem para a etiopatogênese do PFE. Essa mesma análise foi realizada para o grupo alélico PR, obtendo-se da mesma maneira, ausência de significância. As diferenças significantes entre pacientes e controles deveram-se exclusivamente às associações com o gene *HLA-DRB1*, em concordância com os resultados obtidos por PAVONI e cols. (2003).

A ausência de associações entre as variantes dos genes analisados no presente estudo e PFE não devem, de forma alguma, levar-nos a concluir que os produtos desses não se encontram envolvidos na patogênese da doença. A apoptose pode, de fato, estar contribuindo para o estabelecimento e/ou agravamento do quadro clínico do PFE. Entretanto, a ausência de associações mostra que a variação genética de *FAS*, *BAX* e *TP53* não contribui para a variação de susceptibilidade/resistência entre indivíduos. Ou seja, os resultados desse estudo levam-nos a concluir que as variantes genéticas analisadas não alteram a funcionalidade dos produtos gênicos de forma a interferir no curso da doença.

De toda forma, a busca por genes candidatos que possam estar associados com PFE deve continuar. O pênfigo é uma doença endêmica do Brasil, que possui grande impacto por causar grande sofrimento e propiciar infecções oportunistas, contribuindo para a morbidade da população. Resultados positivos e negativos de estudos de associação com genes candidatos contribuem, ambos, para a melhor compreensão dos mecanismos etiopatogênicos. A busca de suas causas e mecanismos de patogênese

contribuirá para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais específicas, uma vez que atualmente a única forma de tratamento são os medicamentos imunossupressores.

7 CONCLUSÃO

Não foram encontradas associações positivas ou negativas com variantes alélicas, genotípicas ou haplotípicas dos genes *FAS*, *BAX* e *TP53*, indicando que as variantes desses genes não contribuem diretamente para a susceptibilidade/resistência ao PFE.

As frequências alélicas dos SNPs analisados neste estudo foram: *BAX-248*A* 6,4% e 8,9%; *TP5312139*C* 30,7% e 38,0%, em euro e afro-brasileiros, respectivamente. Para o gene *FAS* foi estudado apenas o subgrupo de euro-brasileiros e as frequências alélicas para os SNPs foram: *FAS-1377*A* 9,9% e *FAS-670*A* 44,9%.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science** 281(5381):1322-6, 1998.
- APTE, S.S.; MATTEI, M.G.; OLSEN, B.R. Mapping of human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX-delta. **Genomics** 26: 592-594, 1995.
- BASTUJI-GARIN, S.; SOUISSI, R.; BLUM, L.; TURKI, H.; NOUIRA, R.; JOMAA, B.; ZAHAF, A.; BEN OSMAN, A.; MOKHTAR, I.; FAZAA, B. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **J Invest Dermatol** 104(2):302-305, 1995.
- BEHRMANN, I.; WALCZAK, H.; KRAMMER, P.H. Structure of the human APO-1 gene. **Eur J Immunol** 24: 3057-62, 1994.
- BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2^a. Ed., 1995.
- BELL, D.A.; MORRISON, B.; VANDENBYGAART, P. Immunogenetic DNA related factors: Nucleosone spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. **J Clin Invest** 85: 1487-1496, 1990.
- BENNETT, M.; MACDONALD, K.; CHAN, S.W.; LUZIO, J.P.; SIMARI, R.; WEISSBERG, P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. **Science** 282: 290-93, 1998.
- BEROUD, C.; VERDIER, F.; SOUSSI, T. P53 gene mutation: software and database. **Nucl Ac Res** 24(1):147-50, 1996.
- BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from Southern Africa. **Nature** 350: 429-431, 1991.
- CAMPBELL, R.; AIOK, V.; CUNHA, P.; HANS-FILHO, G.; ALVES, G.; ROCHA, R.; FRIEDMAN, H. Endemic pemphigus foliaceus/fogo selvagem. **Anais Bras Dermatol** 76: 13-33, 2001.
- CARGILL, M.; ALTSHULER, D.; IRELAND, J.; SKLAR, P.; ARDLIE, K.; PATIL, N.; SHAW, N.; LANE, C.R.; LIM, E.P.; KALYANARAMAN, N.; NEMESH, J.; ZIAUGRA, L.; FRIEDLAND, L.; ROLFE, A.; WARRINGTON, J.; LIPSHUTZ, R.; DALEY, G.Q.; LANDER, E.S. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. **Nat Genet** 22(3):231-8, 1999.
- CARRERE, N.; LEBLANC, R.M.; BEGUERET, J.; BLOUIN, P.; CHEYROU, A. A new mutation of exon 5 of the P53 gene in breast cancer. **Hum Molec Genet** 2: 1075, 1993.

CARTER, C.O. The inheritance of common congenital malformations. **Prog Med Genet**, New York, 4: 59, 1965.

CERNA, M.; FERNANDEZ-VINA, M.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J.R.; MORAES, M.E.; DIAZ, L.A.; STASTNY, P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens** 42: 138-40, 1993.

CHIOSSI, M.P.; ROSELINO, A.M. Endemic Pemphigus foliaceus ("Fogo selvagem"): a series from the Northeastern region of the State of Sao Paulo, Brazil, 1973-1998. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 43(2): 59-62, 2001.

COUNTER, C.E. The disease called "wildfire". **Arch Dermatol** 80: 49-55, 1959.

DE MARIA, R.; TESTI, R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. **Immunol Today** 19: 121-125, 1998.

DIAZ, L.A.; SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A.; MARTINS, C.R.; CUNHA, P.R.; LOMBARBI, C. ALMEIDA, F.A.; CASTRO, R.M.; MACCA, M.L.; LAVRADO, C.; HANS-FILHO, G.; BORGES, P.; CHAUL, A.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J.C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R.S.; ANHALT, G.J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **J Invest Dermatol** 92: 4-12, 1989a.

DIAZ, L.A.; SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A.; MARTINS, C.R.; CUNHA, P.R.; LOMBARBI, C. ALMEIDA, F.A.; CASTRO, R.M.; MACCA, M.L.; LAVRADO, C.; HANS-FILHO, G.; BORGES, P.; CHAUL, A.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J.C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R.S.; ANHALT, G.J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): I. Clinical features and immunopathology. **J Am Acad Dermatol** 20: 657-69, 1989b.

DOWLING, P.; SHANG, G.; RAVAL, S.; MENONNA, J.; COOK, S.; HUSAR, W. Involvement of CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. **J Exp Med** 184: 1513-1518, 1996.

DUMONT, P.; LEU, J.I.; DELLA PIETRA, A.C.; GEORGE, D.L.; MURPHY, M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet** 33(3):357-65, 2003.

EATON, D.P.; DIAZ, L.A.; HANS-FILHO, G.; SANTOS, V.D.; AOKI, V.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E.A.; SAMPAIO, A.S.; GOTTLIEB, M.S.; GIUDICE, G.J.; LOPEZ, A.; CUPP, E.W. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **J Med Entomol** 35: 120-31, 1998.

ELKON, K.B. Apoptosis and autoimmunity. **J Rheumatol** 24: 6-7, 1997.

FELIX, C.A.; D'AMICO, D.; MITSUDOMI, T.; NAU, M.M.; LI, F.P.; FRAUMENI, J.F.; COLE, D.E.; MCCALLA, J.; REAMAN, G.H.; WHANG-PENG, J.; KNUTSEN, T.; MINNA, J.D.; POPLACK, D.G. Absence of hereditary p53 mutations in 10 familial leukemia pedigrees. **J Clin Invest** 90:653-658, 1992.

FERREIRA, D.M. **Pênfigo foliáceo endêmico e polimorfismo genético da desmogleína 1: existe alguma relação?** Curitiba, 2003. 39f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

FLAMAN, J.M.; WARIDEL, F.; ESTREICHER, A.; VANNIER, A.; LIMACHER, J.M.; GILBERT, D.; IGGO, R.; FREBOURG, T. The human tumor suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. **Oncogene** 12(4):813-8, 1996.

FREBOURG, T.; FRIEND, S.H. Cancer risks from germline P53 mutations. **J Clin Invest** 90:1637-41, 1992.

GUO S, THOMPSON E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372, 1992.

HANS-FILHO, G.; DOS SANTOS V.; KATAYAMA, J.H.; AOKI, V.; RIVITTI, E.A.; SAMPAIO, S.A.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J.R.; MORAES, M.E.; EATON, D.P.; LOPEZ, A.L.; HOFFMAN, R.G.; FAIRLEY, J.A.; GIUDICE, G.J.; DIAZ, L.A. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. **J Invest Dermatol** 107(1):68-75, 1996.

HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E.; EATON, D.; LIN, M.S.; DIAZ, L.A. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) – 1998. **Clin Dermatol** 17: 225-35, 1999.

HARMAN, K.E.; BLACK, M.M. High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. **Br J Dermatol** 140: 865-74, 1999.

HERTL, M.; VELDMAN, C. T-cellular autoimmunity against desmogleins in pemphigus, an autoantibody-mediated bullous disorder of the skin. **Autoimm Rev** 2: 278-283, 2003.

HORIUCHI, T.; NISHIZAWA, S.Y.; HIGUCHI, M.; TUSKAMOTO, H.; HAYASHI, K.; NAGASAWA, K. Association of Fas/Apo-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese. **Rheumatol** 38: 516-20, 1999.

HSU, I.C.; METCALF, R.A.; SUN, T.; WELSH, J.A.; WANG, N.J.; HARRIS, C.C. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature** 350: 427-428, 1991.

HUANG, Q.R.; MANOLIOS, N. Investigation of the –1377 polymorphism on the Fas/Apo-1 promoter in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification. **Pathol** 32: 126-30, 2000.

HUANG, Q.R.; DANIS, V.; LASSERE, M.; EDMONDS, J.; MANOLIOS, N. Evaluation of a new apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatol** 38: 645-51, 1999.

HUANG, Q.R.; MORRIS, D.; MANOLIOS, N. Identification and characterization of polymorphisms in promoter region on human Apo-1/Fas (CD95) gene. **Molec Immunol** 8/9: 577-82, 1997.

IARC P53 DATABASE [online]. Disponível: www.iarc.fr/p53/index.html. [capturado em 02 de dezembro de 2004].

INAZAWA, J.; ITOH, N.; ABE, T.; NAGATA, S. Assignment of the Fas antigen gene (FAS) to 10q.24.1. **Genomics** 14: 821-22, 1992.

ITOH, N.; YONEHARA, S.; ISHII, A.; YONEHARA, M.; MIZUSHIMA, S.; SAMESHIMA, M.; HASE, A.; SETO, Y.; NAGATA, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell** 66: 233-243, 1991.

JONES, J.C.; ARNN, J.; STACHELIN, L.A. Human antibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proc Natl Acad Sci – USA** 81:2781-785, 1984.

JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. **Genética Médica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2^a. Ed., 2000.

KAGI, D.; VIGNAUX, F.; LEDERMANN, B.; BURKI, K.; DEPRAETERE, V.; NAGATA, S.; HENGARTNER, H.; GOLDSTEIN, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. **Science** 265: 528-30, 1994.

KIBERSTIS, P.; ROBERTS, L. It's not just the genes. **Science** 296: 685, 2002.

KING, R.A.; ROTTER, J.I.; MOTULSKY, A.G. The approach to genetics bases of common diseases. In *The Genetic Basis of Common Diseases*. Oxford University Press, New York, 1992.

KLAES, R.; RIDDER, R.; SCHAEFER, U. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. **J Mol Med** 77: 299-302, 1999.

KNUDSON, C.M.; TUNG, K.S.K.; TOURTELLOTTE, W.G.; BROWN, G.A.J.; KORSMEYER, S.J. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. **Science** 270: 96-99, 1995.

KUBY, J. **Immunology**. W.H. Freeman and Company, New York. 3^a. Ed., 1997.

KUHLMANN, T.; GLAS, M.; ZUM BRUCH, C.; MUELLER, W.; WEBER, A.; ZIPP, F.; BR6UCK, W. Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 polymorphism in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 129: 154-60, 2002.

KUMAR, S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. **Cell Death Diff** 6: 1060-66, 1999.

LAHIRI D.K, NURNBERGER J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for RFLP studies. **Nucl Ac Res** 19: 5444, 1991.

LAMB, P.; CRAWFORD, L. Characterization of the human p53 gene. **Molec Cell Biol.** 6: 1379-85, 1986.

LAMHAMEDI, S.; SHIRWAN, H. A expression of FasL as a stable cell-surface molecule is important to its apoptotic function. **Transplantation Proceed** 33: 259, 2001.

LEBLANC, H.; LAWRENCE, D.; VARFOLOMEEV, E.; TOTPAL, K.; MORLAN, J.; SCHOW, P.; FONG, S.; SCHWALL, R.; SINICROPI, D.; ASHKENAZI, A. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. **Nat Med** 8: 274-281, 2002.

LEE, Y.H.; KIM, Y.R.; JI, J.D.; SOHN, J.; SONG, G.G. P53 codon 72 polymorphism and rheumatoid arthritis. **J Rheumatol** 28(11): 2392-4, 2001.

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E.A.; DIAZ, L.A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Exp Med** 197(11): 1501-10, 2003.

LOMBARDI, C.; BORGES, P.C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A.; FREIDMAN, H. MARTINS, C.R.; SANCHES, J.A.; CUNHA, P.R.; HOFFMANN, R.G.; DIAZ, L.A. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol** 98: 847-50, 1992.

LYNCH, D.H.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M.R. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. **Immunol Today** 16: 569-573, 1995.

MALKIN, D.; LI, F.P.; STRONG, L. C.; FRAUMENI, J.F.; NELSON, C.E.; KIM, D.H.; KASSEL, J.; GRYKA, M.A.; BISCHOFF, F.Z.; TAINSKY, M.A.; FRIEND, S.H. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 250: 1233-38, 1990.

MARTEL, P.; GILBERT, D.; BUSSON, M. Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. **Genes Immun** 3: 205-10, 2002.

MARZO, I.; BRENNER, C.; ZAMZAMI, N.; JURGENSMEIER, J.M.; SUSIN, S.A.; VIEIRA, H.L.A.; PREVOST, M.C.; XIE, Z.; MATSUYAMA, S.; REED, J.C.; KROEMER, G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. **Science** 281: 2027-2031, 1998.

MATSUDA, Y.; KUSANO, H.; TSUJIMOTO, Y. Chromosomal assignment of the Bcl2-related genes, Bcl2l and Bax, in the mouse and rat. **Cytogenet Cell Genet.** 74: 107-110, 1996.

MCBRIDE, O.W.; MERRY, D.E.; OREN, M.; GIVOL, D. Human p53 cellular tumor antigen is on chromosome 17p13. **Cytogenet Cell Genet.** 40: 694-695, 1985.

MCBRIDE, O.W.; MERRY, D.; GIVOL, D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). **Proc Natl Acad Sci - USA** 83: 130-134, 1986.

MEIJERINK, J.P.P.; MENSINK, E.J.B.M.; WANG, K.; SEDLAK, T.W.; SLOETJES, A.W.; DE WITTE, T.; WAKSMAN, G.; KORSMEYER, S.J. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. **Blood** 91: 2991-2997, 1998.

METZGER, A.K.; SHEFFIELD, V.C.; DUYK, G.; DANESHVAR, L.; EDWARDS, M.S.B.; COGEN, P.H. Identification of a germ-line mutation in the p53 gene in a patient with an intracranial ependymoma. **Proc Natl Acad Sci - USA** 88: 7825-7829, 1991.

MILLER, M.P. **RxC: a program for the analysis of contingency tables via metropolis algorithm computer**. Departamento of biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.

MINELLI, L. Pênfigo foliáceo sul-americano no estado do Paraná, Brasil, 1941-1980. **Bol Oficina Sanit Panam** 101: 114-21, 1986.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human BAX gene. **Cell** 80: 293-299, 1995.

MOHAN, C.; ADAMS, S.; STANIK, V.; DATTA, S.K. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. **J Exp Med** 177: 1367-1381, 1993.

MORAES, J.R.; MORAES, M.E.; FERNANDEZ-VINA, M.; DIAZ, L.A.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.T.; ALVAREZ, R.R.; SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.; STASTNY, P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogen** 33: 388-91, 1991.

MORAES, M.E.; FERNANDEZ-VINA, M.; LAZARO, A.; DIAZ, L.A.; FILHO, G.H.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E.; AOKI, V.; STASTNY, P.; MORAES, J.R. Na epitope in the third hypervariable region of the DBR1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens** 49: 35-40, 1997.

MOSHYNSKA, O.; SANKARAN, K.; SAXENA, A. Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. **J Clin Pathol: Mol Pathol** 56: 205-209, 2003.

MÜLLAUER, L.; GRUBER, P.; SEBINGER, D.; BUCH, J.; WOHLFART, S.; CHOTT, A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenic factor for human disease. **Mut Res** 488: 211-31, 2001.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The death factor. **Science** 267: 1449-1456, 1995.

NEWTON, K.; HARRIS, A.W.; BATH, M.L.; SMITH, K.; STRASSER, A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. **EMBO J** 17: 706-18, 1998.

NOSSAL, G. Negative selection of lymphocytes. **Cell** 76: 229-52, 1994.

NOLSOE, R.L.; KRISTIANSEN, O.P.; SANGTHONGPITAG, K.; LARSEN, Z.M.; JOHANNESSEN, J.; KARLSEN, A.E.; POCIOT, F.; NERUP, J.; VERGE, C.F.; MANDRUP-POULSEN, T. Complete molecular scanning of the human Fas gene: mutational analysis and linkage studies in families with type I diabetes mellitus. The Danish Study Group of Diabetes in Childhood and The Danish IDDM Epidemiology and Genetics group. **Diabetol** 43(6):800-808, 2000.

O'CONNELL, J.O.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN, F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer expressin Fas ligand. **J Exp Med** 184: 1075-1082, 1996.

OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell** 74: 609-19, 1993.

OMIM [on line]. Disponível: www.ncbi.nlm.nih.gov. [capturado em 01 de dezembro de 2004].

PARHAM, P. **O sistema imune**. Artmed editora, Porto Alegre, 1^a. Ed., 2001.

PAVONI, D.P. Estudo de associação entre variantes dos genes HLA-DRB e CTLA4 e pênfigo foliáceo endêmico. 2000. 108p. **Dissertação** (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, 2000. Orientador: Maria Luiza Petzl-Erler.

PAVONI, D.P.; ROXO, V.S.; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M.L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. Dominant protection, dose-dependent susceptibility. **Genes Immun** 4: 110-16, 2003.

PEREIRA, N.F.; HANSEN, J.A.; LIN, M.T.; ROXO, V.M.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER, M.L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine** 21;28(6):233-241, 2004.

PETRONIS, A. Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics. **Trends Genet.** 17(3): 142-6, 2001.

PETZL-ERLER, M.L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens** 33: 408-14, 1989.

PINTI, M.; TROIANO, L.; NASI, M.; MORETTI, L.; MONTERASTELLI, E.; MAZZACANI, A.; MUSSI, C.; VENTURA, P.; OLIVIERI, F.; FRANCESCHI, C.; SALVIOLI, G.; COSSARIZZA, A. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and FasL (CD178) in human longevity: studies on centenarians. **Cell Death Differ** 9(4):431-438, 2002.

POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J.L.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. A model for p53-induced apoptosis. **Nature** 389: 300-05, 1997.

PRIVES, C.; HALL, P.A. the p53 pathway. **J Pathol** 187: 112-126, 1999.

PROBST, C.M. **CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1.** Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, UFPR, Curitiba, 1998.

PUVIANI, M.; MARCONI, A.; COZZANI, E.; PINCELLI, C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. **J Invest Dermatol** 120(1): 167-67, 2003.

RAMPINO, N.; YAMAMOTO, H.; IONOV, I.; LI, Y.; SAWAI, H.; REED, J.C.; PERUCHO, M. somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science** 275: 967-69, 1997.

REBBECK, T.R.; SPITZ, M.; WU, X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. **Nat Rev Genet** 5: 589-597, 2004.

RIEUX-LAUCAT, F.; LE DEIST, F.; FISCHER, A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetics defects of apoptosis pathways. **Cell Death Diff** 10(1): 124-33, 2003.

RISCH, N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature** 405(6788): 847-56, 2000.

ROSENMAN, H.; MEINER, Z.; KAHANA, E.; ALADJEM, Z.; FRIEDMAN, G.; BEN-YEHUDA, A.; GRENADER, T.; WERTMAN, E.; ABRAMSKY, O. An association study of the codon 72 polymorphism in the pro-apoptotic gene p53 and Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 340(1):29-32, 2003.

ROXO, V.M.S. Estudo de associação entre as variantes dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1, TNF, LTA e FAS e o pênfigo foliáceo endêmico. 2003. 158p. **Tese** (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, 2003. Orientador: Maria Luiza Petzl-Erler.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning-a laboratory manual.** 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, 1989.

SAXENA, A.; MOSHYNSKA, O.; SANKARAN, K.; VISWANATHAN, S.; SHERIDAN, D. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. **Cancer Letters** 187: 199-205, 2002.

SCHENDEL, S.L.; MONTAL, M.; REED, J.C. Bcl-2 family proteins as ion-channels. **Cell Death Diff** 5: 372-80, 1998.

SCHNEIDER RF, ROESSLY D, EXCOFIER L. **ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis, version 2000.** Genetics and Biometry Laboratories, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva, 2000.

SIEGEL, R.M.; FLEISHER, T.A. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. **J Allergy Clin Immunol** 103: 729-38, 1999.

SLEE, E.A.; ADRIAN, C.; MARTIN, S.J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Diff** 6: 1067-74, 1999.

SRIVASTAVA, S.; ZOU, Z.; PIROLLO, K.; BLATTNER, W.; CHANG, E. H. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. **Nature** 348: 747-49, 1990.

STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I. M.; MATLASHEWSKI, G.; BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. **Nature** 393:229-34,1998.

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GOLSTEIN, P.; NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell** 75: 1169-1178, 1993.

SVEJGAARD A, JERSILD C, STAUB-NIELSEN L, BODMER WF. HLA antigens and disease – statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens** 4: 95-105, 1974.

SVEJGAARD A, RYDER, L.P. HLA antigens and disease: Detecting the strongest association. **Tissue Antigens** 43: 18-27, 1994.

TAKAHASHI, T.; TANAKA, M.; BRANNAN, C.I.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G.; SUDA, T.; NAGATA, S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. **Cell** 76: 969-976, 1994.

TAUBERT, H.; THAMM, B.; MEYE, A.; BARTEL, F.; ROST, A.K.; HEIDENREICH, D.; JOHN, V.; BRANDT, J.; BACHE, M.; WURL, P.; SCHMIDT, H.; RIEMANN, D. The p53 status in juvenile chronic arthritis and rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol** 122(2):264-9, 2000.

TAX, W.J.M.; KRAMERS, C.; VAN BERDEN, M.C.J. Apoptosis, nucleosides and nephritis in systemic lupus erythematosus. **Kidney Into** 48: 666-673, 1995.

TOGUCHIDA, J.; YAMAGUCHI, T.; DAYTON, S. H.; BEAUCHAMP, R. L.; HERRERA, G. E.; ISHIZAKI, K.; YAMAMURO, T.; MEYERS, P. A.; LITTLE, J. B.; SASAKI, M. S.; WEICHSELBAUM, R. R.; YANDELL, D. W. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. **N Engl J Med** 326: 1301-08, 1990.

VAISHNAW, A.K.; ORLINICK, J.R.; CHU, J.L.; KRAMMER, P.H.; CHAO, M.V.; ELKON, K.B. The molecular basis for apoptosis defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations. **J Clin Invest** 103: 355-63, 1999.

VAN VEEN, T.; KALKERS, N.F.; CRUSIUS, J.B.A.; VAN WINSSEN, L.; BARKHOF, F.; JONGEN, P.J.H.; PEÑA, A.S.; POLMAN, C.H.; UITDEHAAG, B.M.J. The FAS -670

polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 128: 95-100, 2002.

VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. Cell death in development. **Cell** 96(2): 245-54, 1999.

VAUX, D.L.; FLAVELL, R.A. Apoptosis genes and autoimmunity. **Cur Open Immunol** 12: 719-24, 2000.

WATANABE-FUKUNAGA, R.; BRANNAN, C.I.; COPERLAND, N.G.; JENKINS, N.A.; NAGATA, S. Lymph proliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature** 356: 314-17, 1992.

WANG, X.; BRÉGÈGÈRE, F.; FRUSIC-ZLOTKIN, M.; FEINMESSER, M.; MICHEL, B.; MILNER, Y. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. **Apoptosis** 9: 131-143, 2004.

WILLETT, W.C. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. **Science** 296: 695-98, 2002.

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann Hum Genet** 19: 251-253, 1955.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.; JONES, D.P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science** 275: 1129-32, 1997.

ZAKUT-HOURI, R.; BIENZ-TADMOR, B.; GIVOL, D.; OREN, M. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. **EMBO J.** 4(5):1251-5, 1985.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1 – TERMO DE ANUÊNCIA

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

“IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO”

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

- **OBJETIVO DO ESTUDO**

O objetivo desse estudo é conhecer porque certas pessoas contraem o fogo selvagem (pênfigo foliáceo endêmico) enquanto outras aparentemente são resistentes ao desenvolvimento dessa doença. A predisposição ao fogo selvagem depende de vários fatores. Alguns desses fatores são do ambiente no qual a pessoa vive e de seus hábitos alimentares ou medicamentos. Outros são genéticos, hereditários. Entretanto, os fatores de predisposição ainda são pouco conhecidos. Esse trabalho de pesquisa científica vai esclarecer quais são os genes que tornam a pessoa mais ou menos predisposta à doença. O resultado poderá auxiliar para a prevenção, tratamento e cura da doença.

- **PROCEDIMENTOS**

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (cerca de 26 ml, ou seja, correspondente a meio copo de cafezinho) e você irá responder a algumas perguntas sobre a sua origem e a origem de seus ancestrais, assim como sobre os seus hábitos e condições de vida.

- **RISCOS**

Não há riscos previstos nesta etapa do estudo, sendo que o único desconforto poderá ser a retirada da amostra de sangue.

- **BENEFÍCIOS**

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você, mas o conhecimento adquirido com este estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da doença. Isso poderá contribuir para a elaboração de métodos mais eficientes de prevenção e tratamento, com menos efeitos indesejados.

- **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado médico para justificar a sua falta.

- **ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS**

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

- **IDENTIFICAÇÃO**

A sua identificação será mantida confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

- **EQUIPE DE PESQUISADORES**

Os pesquisadores envolvidos nesse projeto são:

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, UFPR

Colaboradores: Dr. Alfredo Marquart, Hospital Adventista do Pênfigo; Biólogas Karen Francine Köhler e Danielle Malheiros Ferreira, Mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Genética, UFPR.

Diante do exposto acima eu, _____, abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que poderão dele resultar. Concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

_____, _____ de _____ de _____
local data

Assinaturas

Voluntário
RG

Pesquisador
RG

9.2 ANEXO 2 – FICHA DE AVERIGUAÇÃO

PROJETO PÊNFIGO FOLIÁCEO – janeiro-fevereiro de 2004

Código do indivíduo _____ No. do prontuário: _____

Identificação:

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____ Sexo: _____ Estado civil: _____

Grupo racial: _____

Dia/Mês/Ano do nascimento: _____ Município: _____

Município de residência atual / próximo a: _____

Municípios onde viveu/ tempo de residência (animais/insetos/rios/lavouras)

1) _____

2) _____

3) _____

4) _____

5) _____

6) _____

Município onde apareceu a lesão primária: _____ Idade _____ Ano: _____

Época do ano na qual apareceu a lesão: _____

Região do corpo na qual apareceu a lesão primária: _____

Houve disseminação das lesões? _____

Quem o encaminhou para o tratamento? _____

Aonde foi iniciado o tratamento: _____

Ocupação: _____ Grau de Instrução _____

Tipo de Habitação (n.º de cômodos/banheiro): _____

Quantas pessoas vivem na habitação? _____

• Diagnóstico/classificação _____

Refere-se a outras doenças/ complicações? _____

• Tratamentos anteriores: _____

Remédios/Quais/Durante quanto tempo? _____

Outros agentes químicos / quando: _____

• Tratamento atual: _____

Tratamento interrompido? _____

Hábitos alimentares: _____

FAMÍLIA DO ENTREVISTADO:

Nome do PAI: _____

Onde ele nasceu? (Município): _____ Origem

(Ascendência) do PAI: _____

Cor do pai/ semelhante à sua? _____

Nome da MÃE: _____

Onde ela nasceu? (Município): _____

Origem (Ascendência) da MÃE: _____

Cor da mãe/ semelhante à sua? _____

Pais são consanguíneos? _____

(nem primos distantes??) _____

Número de irmãos: _____ Todos filhos dos mesmos pais? _____ Todos vivos? _____

Ordem do nascimento: _____

Quantas x (s) engravidou? _____

Número de filhos? _____

Quantos nasceram vivos? _____

Algum aborto (perca)? _____

Alguém mais na família com a mesma doença? _____

A doença foi semelhante à sua? _____

Caso haja fazer a genealogia dos familiares (no verso)

Local da averiguação: _____

DATA da averiguação: _____

Averiguador: _____

Observações: